Die rho$^-$-Mutation bei Hefe: genetische Untersuchungen an Populationen von rho$^-$-Klonen

Salima Mathews

Diss Minden
1984

Die rho^--Mutation bei Hefe: genetische Untersuchungen an Populationen von rho^--Klonen

Dissertation der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Salima Mathews
München, November 1983

1. Berichterstatter: Prof. Dr. R.J. Schweyen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Januar 1984

INHALTSVERZEICHNIS

I		Einleitung	1
II		Material und Methoden	9
	1.	Stämme	9
	2.	Chemikalien	10
	3.	Abkürzungen	10
	4.	Medien und Puffer	12
	5.	Mutagenese mit Ethidiumbromid	13
	6.	$MnCl_2$-Mutagenese	14
	7.	Bestimmung der temperaturabhängigen Bildung atmungsdefekter Zellen	14
	8.	Genetische Lokalisierung von rho$^-$-Mutanten mittels Kreuzung	15
	9.	Kartierung von mit$^-$-Mutanten mittels Kreuzungen	15
	10.	Induktion hochsuppressiver rho$^-$-Mutanten	15
	11.	Präparation von Mitochondrien	16
	12.	Extraktion mitochondrialer DNS	16
	13.	Gewinnung von mtRNS	17
	14.	Restriktionsverdau, Elektrophorese und Isolierung von DNS-Fragmenten aus Gelen	17
	15.	Radioaktive Markierung von mitochondrialer DNS durch "nick translation"	18
	16.	Übertragung von DNS aus Agarosegelen auf Nitrocellulosefilter	18
	17.	Hybridisierung von nitrocellulosegebundener DNS mit ^{32}P-mtDNS	19
	18.	Transfer von mtRNS aus Hg-Gelen auf DBM-Papier	19
	18.1.	Herstellung des ABM-Papiers	19
	18.2.	Aktivierung des ABM-Papiers	19
	18.3.	Transfer der mtRNS	20
	19.	Hybridisierung von filtergebundener RNS mit "nick translatierter DNS	20

III Ergebnisse 21

Allgemeine Einführung 21

1. Induktion und Charakterisierung von rho$^-$ -Mutanten 24

1.1. Mutagene Behandlungen 24

1.2. Nachweis der Retention mitochondrialer Marker in rho$^-$ -Klonen 27

1.3. Einteilung der isolierten petites in Klassen 31

1.3.1. Einzeldeletionen tragende petites 31

1.4. Petites vom re-arrangiertem Typ 33

2. Quantitative Analyse von rho$^-$ - Populationen 35

2.1. Marker-Retention in rho$^-$-Klonen 35

2.2. Verteilung von rho$^-$-Endpunkten auf dem mitochondrialen Genom 38

2.3. Marker-Retention und mtDNS-Endpunkte in rho$^-$-Subklonen 46

2.3.1. Subklone im Genomsegment TSM-CAP/ERY-M4696-OLI1/M4490-M4752-COB 46

2.3.2. Subklone im Gen COB 49

3. Untersuchungen zur Suppressivität 56

3.1. Charakterisierung von Mutanten bezüglich ihrer Suppressivität 56

3.2. Genetische Lokalisierung hochsuppressiver rho$^-$-Mutanten 60

3.3. Physische Kartierung hochsuppressiver Mutanten auf dem mitochondrialen Genom 60

3.4. Identifizierung der Restriktionsfragmente mit putativen "origin"-Sequenzen 62

4. Charakterisierung einer rho$^-$-Mutante aus dem tRNS$^{ser}_{UCN}$-Gen (M4696) 65

4.1. Präparation und gelelektrophoretische Auftrennung mitochondrialer Transkripte 65

5. Bestimmung genetischer Distanzen von Markern 69

5.1. Gene auf dem rho$^+$-Genom 69

	6. Feinstrukturkartierung des COB-Genes	75
IV	Diskussion	81
V	Zusammenfassung	93
VI	Literaturverzeichnis	112

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554009_0025

I. EINLEITUNG

Das Mitochondrion ist das kleinste bisher bekannte genetisch (teil)-autonome System, ausgestattet mit einem Genom codierend für maximal 50 Gene und einem eigenen Apparat für die Expression der darin niedergelegten Information. Dies und die zentrale funktionelle Bedeutung des Mitochondrions für die Energiegewinnung in der Eukaryontenzelle haben im letzten Jahrzehnt viele Forscher dazu bewegt, das genetische System dieser Zellorganelle zu studieren. Die meisten Untersuchungen konzentrieren sich auf Mitochondrien der Säugetiere (Attardi et al. 1982, Review) und der Pilze, insbesondere auf Saccharomyces cerevisiae (Dujon 1981, Review).
Die Grösse des mitochondrialen Genoms, eines circulären DNS-Moleküls, ist sehr unterschiedlich. S. cerevisiae mit ca. 75 000 bp und der Mensch mit 16 569 bp (Anderson et al. 1981) beherbergen die grösste bzw. die kleinste mtDNS. Trotz dieser Grössenunterschiede codieren alle mtDNAs (mit kleinen Abweichungen) für folgende an S. cerevisiae nachgewiesenen Produkte:

- Untereinheit VI, VIII und IX der ATPase,
- Untereinheit I, II und III der Cytochromoxidase,
- Apocytochrom b,
- 24 tRNAs,
- 2 rRNAs.

Ein weiteres Produkt, var1, ein Ribosomen-assoziiertes Protein unbekannter Funktion, ist bei S. cerevisiae nachgewiesen (Douglas et al. 1976, Terpstra et al. 1979 a & b , Hudspeth et al. 1982). Neben den Genen für diese Produkte sind sowohl bei Pilzen wie bei Säugern sog. urf-Sequenzen ("unassigned reading frames") entdeckt worden; die Expression dieser potentiell Protein-codierenden Sequenzen bleibt im einzelnen noch nachzuweisen.
Das Mitochondrion ist als genetisch teil-autonom zu bezeichnen, da es nicht selbst für Komponenten der Replikation und der Transkription der mtDNS, für ribosomale Proteine und Aminoacyl-Synthetasen codiert. Diese Proteine, sowie die grosse Masse der Komponenten der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung, der Membranen und Matrixenzyme - insgesamt mehrere hundert Proteine - werden durch Kerngene codiert, an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert und in die Mitochondrien eingebracht (Schatz 1974, Schneller 1976, Wintersberger et al. 1976,

Levens 1981, Dieckmann et al. 1982; Schatz 1983).
Die Bäckerhefe, Saccharomyces cerevisiae, kann als fakultativer Anaerobier über extramitochondriale Prozesse genügend Energie gewinnen. Dies ermöglicht die Isolierung von Mutanten mit Defekten in mitochondrialer Energiegewinnung und damit den genetischen Zugang zur Problematik der Genstruktur und -organisation bei Mitochondrien allgemein.

Mitochondriale Mutationen lassen sich 3 Klassen, ANT^R, mit^-/syn^- und rho^-/rho^o zuordnen. ANT^R-Mutationen bedingen Resistenz

- gegen den einen oder anderen, am mitochondrialen Translationsapparat wirksamen Hemmstoff wie Chloramphenicol, Erythromycin, Paromomycin, Spiramycin,
- gegen Oligomycin, einen Hemmstoff der mitochondrialen ATPase oder
- gegen Antimycin, Diuron, Mucidin oder Myxothiazol, Hemmstoffe des bc_1-Komplexes der Atmungskette.

Diese Resistenzen sind durch Punktmutationen in den Genen codierend für rRNA (21S: ERY^R, CAP^R (Bolotin et al. 1971, Grivell et al. 1973, Netter et al. 1974), 15S: PAR^R (Kutzleb et al. 1973, Wolf et al. 1973, Tabak et al. 1979)), für ATPase-Untereinheiten VI und IX ($OLI1^R$, $OLI2^R$: Avner et al. 1973, Hensgens et al. 1979, Tzagoloff et al. 1976a) oder für Apocytochrom b (COB; Burger et al. 1976, Michaelis et al. 1976, Colson et al. 1977, Schweyen et al. 1976b & 1977) bedingt.

Die zweite Klasse, mit^-- und syn^--Mutationen, sind Punktmutationen, in einigen Fällen auch Deletionen (Tzagoloff et al. 1975b; Dujon 1981,Review), die jeweils eines der Produkte der oben genannten Gene bzw. der tRNA-Gene betreffen. (In einigen wenigen Fällen sind sekundäre Interaktionen beschrieben worden, so dass z.B. mit^--Mutationen in der COB-Region auch die Expression des OXI3-Genproduktes beeinflussen (Kotylak et al. 1976 & 1977a, Netter et al. 1982). Die Bezeichnung mit^- bezieht sich auf Mutationen in Protein-codierenden Genen, syn^- auf rRNA- und tRNA-codierenden Gene. Letztere sind nur als 'leaky' oder konditionelle Mutanten bekannt, da der völlige Defekt des mitochondrialen Proteinsynthesesystems zur häufigen Bildung von rho^--Zellen führt (Williamson et al. 1970).

Diese dritte Klasse der mitochondrialen Mutanten zeichnet sich aus durch Makrodeletionen der mtDNS (rho^-) oder deren totalen Verlust (rho^o); die in rho^- verbliebenen mtDNS-

Sequenzen sind von Mutante zu Mutante verschieden bezüglich Grösse und zurückbehaltenem Genomsegment (Faye et al. 1973). So wurde in einigen Fällen die Retention von nur wenigen hundert Basenpaaren (Borst et al. 1977; Bernardi 1979, Review), in anderen aber einige Zehntausend Basenpaare (Morimoto et al. 1975 & 1976, Claisse et al. 1978, Grosch et al. 1981) nachgewiesen. Zumindest in den ersten liegt die zurückbehaltene Sequenz vielfach reiteriert vor (Faye et al. 1973, Lazowska et al. 1974) wie in Abb. 1 schematisch aufgezeigt.

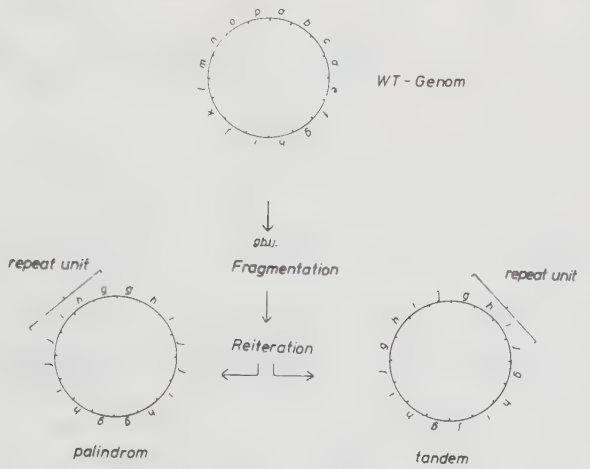
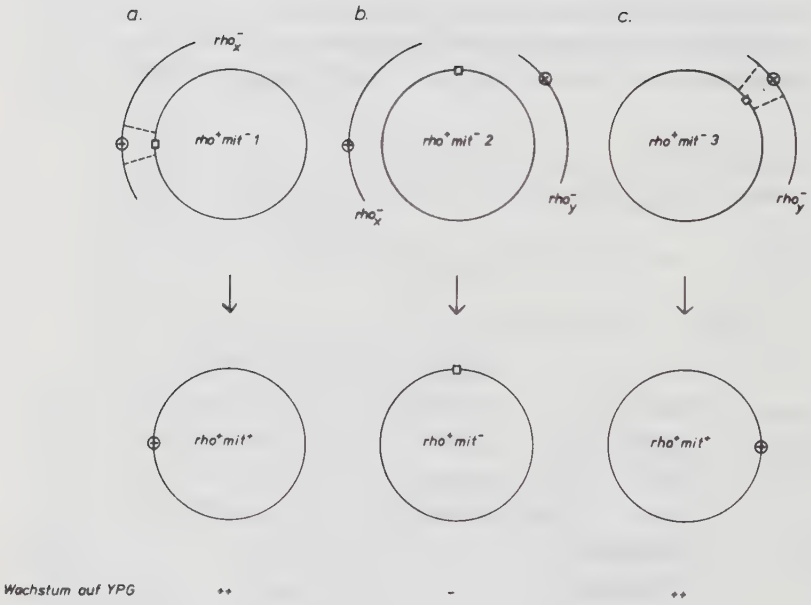


Abb. 1: Entstehung von rho⁻-Mutanten

Buchstaben a-p symbolisieren Sequenzen auf dem mitochondrialen Genom. Das 'repeat unit', die in der rho⁻-Mutante zurückbehaltene Sequenz, kann nach der Fragmentation in Tandem- oder Palindromanordnung reiteriert vorliegen.

Ein wesentliches Kriterium der rho⁻-Mutante ist der Verlust der mitochondrialen Proteinsynthese und infolgedessen der Funktion der Atmung und oxidativen Phosphorylierung. Damit sind sie phänotypisch zu unterscheiden von mit⁻-Punkt- und mit⁻-Deletionsmutanten, denen nur ein (oder ausnahmsweise zwei) Translationsprodukte fehlen, was zum Verlust der Atmung oder der oxidativen Phosphorylierung führt. Genetisch sind rho⁻ und mit⁻ durch folgende Kreuzungen zu unterscheiden:

1) $rho^{+}mit^{-}_{1}$ x $rho^{+}mit^{-}_{n}$ ⟶ $rho^{+}mit^{+}$ (= Wildtyp)
2) $rho^{-}_{x}mit^{+}_{1}$ x $rho^{+}mit^{-}_{1}$ ⟶ $rho^{+}mit^{+}$ (= Wildtyp)
3) rho^{-}_{x} x rho^{-}_{y} ⟶ rho^{-}



Wachstum auf YPG	++	-	++

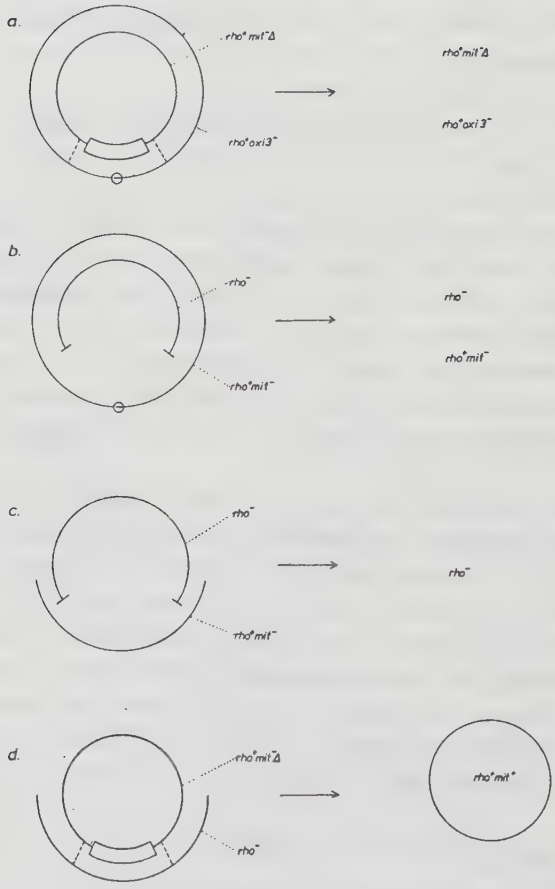
Die Kreuzung einer Mutante mit^-_1 mit beliebigen anderen Mutanten (mit^-_n, Fall 1) führt zur Bildung von rho^+mit^+-Rekombinanten, sofern mit^-_n und mit^-_1 Mutationsorte mit einem Abstand von wenigstens ca. 10 bp darstellen. (Dieser Wert ergibt sich aus dem Vergleich von Rekombinationsdaten zwischen mit^- und deren molekularer Positionsbestimmung; Sebald et al. 1979, Jacq et al. 1982, de la Salle et al. 1982, Schweyen: persönl. Mitteilung).
Eine gegebene rho^-_x (Fall 2) wird in Kreuzungen mit manchen mit^--Mutanten (z.B. mit^-_1, Abb. 2) rho^+mit^+-Rekombinanten bilden, nicht aber mit anderen mit^-.
Kreuzungen verschiedener rho^- miteinander (Fall 3: rho^-_x x rho^-_y, Abb. 3) ergeben keine rho^+-Rekombinanten (vielleicht mit Ausnahme nascierender rho^-; Oakley & Clark-Walker 1978). Dies könnte seinen Grund darin haben, dass nach möglicher Wiederherstellung des rho^+-Genoms durch Rekombination zweier rho^--mtDNS-Moleküle (vgl. Abb. 3, Fall c) das mitochondriale Proteinsynthesesystem von keinem der beiden rho^--Kreuzungspartner eingebracht wird und nicht de novo gebildet werden kann.
Diese rho^-- und rho^o-Mutanten werden vorwiegend bisher nur bei Saccharomyces cerevisiae gefunden (ausgenommen z.B. Torulopsis glabrata, Clark-Walker et al. 1981), treten aber dort spontan mit Häufigkeiten bis zu 1% auf. Sie waren von ausserordentlicher Bedeutung für die Aufklärung der Genom- und Genorganisation der mtDNS bei Hefe. Denn die rho^--Bildung ist als ein natürliches Klonierungssystem zu betrachten, in dem jedes beliebige Teilsegment des Genoms isoliert und amplifiziert werden kann. Bei der Vielzahl von Markern in der Form ANT^R-, mit^-- und syn^--Mutationen hat der Genetiker die Möglichkeit - analog einer "Dele-

Abb. 2: Kreuzungen zwischen rho^- und mit^-

rho^- sind in der Regel von Wildtyp-Stämmen abgeleitet und tragen daher nur mit^+ Information.

a, c: Die rho^--mtDNS-Segmente tragen die WT-Information (mit^+) des in der mit^--Mutante veränderten Genes (—○—). Durch Rekombination können rho^+mit^+-Zellen gebildet werden, die atmungskompetent sind und daher auf nicht-vergärbaren Substraten (YG) wachsen.

b : Keine der beiden rho^--mtDNS-Moleküle trägt die Wildtyp-Sequenz des in mit^-_2 mutierten Genes. Rekombination zu rho^+mit^+ bleibt daher aus.


a.
rho° mit⁻Δ
rho°oxi3⁻
rho°mit⁻Δ
rho°oxi3⁻
b.
rho⁻
rho°mit⁻
rho⁻
rho°mit⁻
c.
rho⁻
rho°mit⁻
rho⁻
d.
rho°mit⁻Δ
rho⁻
rho°mit⁺

tionskartierung" - die in der rho$^-$-Mutante deletierten bzw. zurückbehaltenen Gensequenzen durch Kreuzung(Abb. 2) zu bestimmen und daraus eine Genkarte zu erstellen. Die Restriktionsanalyse der rho$^-$-mtDNS lässt zudem erkennen, welches Teilstück der rho$^+$mtDNS-Sequenz zurückbehalten wird. Die Kombination genetischer mit biochemischen Daten erlaubt schliesslich die Zuordnung von Genen zu Restriktionsfragmenten der mtDNS und damit zu einer genetisch-physischen Karte des mitochondrialen Genoms der Hefe (Sanders et al. 1976 , Heyting et al. 1979a,Grosch et al. 1981).

Die Genkarte des mitochondrialen Genoms stellt sich heute dar wie in Abb. 4 gezeigt. Überraschenderweise wurde bei der Kartierung von Genom und Genen im Mitochondrium der Hefe eine bis dahin nur für das Kerngenom der Eukaryonten gültige Form der Genorganisation (Chambon 1981, Review) nachgewiesen: das Mosaikgen. Letzteres beschreibt das Gen als DNS-Abschnitt, der die Information des Polypeptids nicht in einem Stück enthält, sondern von Sequenzen unterbrochen wird, die nicht dieses Genprodukt codieren (intervenierende Sequenzen, Introns). Diesem neuen Typus, der bisher für höhere Eukaryonten als charakteristisch galt, folgen bei der Hefe die Gene für

1) Apocytochrom b (COB; Slonimski et al. 1978a & b, Haid et al. 1979, Nobrega et al. 1980a, Lazowska et al. 1980),
2) Untereinheit I der Cytochromoxidase (OXI3; Bonitz et al. 1980a, Hensgens et al. 1983a & b),
3) 23 rRNS (Heyting et al. 1979b,Dujon 1980a).

Darüberhinaus hat die Restriktionsanalyse aufgezeigt, dass COB und OXI3 in polymorphen Formen vorkommen. Innerhalb der oben genannten

Abb. 3: Genetische Differenzierung zwischen mit$^-$-Punkt- und mit$^-$-Deletionsmutanten (Δ).

a, b Beiden Kreuzungspartnern fehlt das gleiche Wildtyp-Allel. Eine Rekonstitution zum Wildtyp ist daher unmöglich.

c, d Hierdurch kann zwischen Punkt- und Deletionsmutation entschieden werden: im einen Fall kann eine rho$^-$ mit entsprechendem Wildtyp-Allel zur Rekonstitution führen (d). Im zweiten Fall kann die gleiche rho$^-$ dies nicht ermöglichen (c).
Ein rho$^-$-Genom mit dem Verlust nur einer Genregion wie in (b) und (c) skizziert, ist nur hypothetisch. Da Experimente entsprechend (a) bis (d) hier nicht durchgeführt wurden, bleibt offen, ob petites mit Verlust nur einer Region des mitochondrialen Genoms vom Typ der rho$^-$ oder mit$^{\Delta}$ waren.

Strukturgene ist die Anzahl vorhandener Introns von Stamm zu Stamm variabel.

Ein weiteres Mitochondrien-spezifisches Phänomen sind die offenen Leserahmen ('urf') innerhalb mehrerer Introns (Lazowska et al. 1980, Nobrega et al. 1980a, Bonitz et al. 1980b). Sie geben zu der Vermutung Anlass, dass diese Abschnitte Genprodukte codieren könnten. Hierfür spricht der durch Komplementation erhaltene Befund, dass Introns für in trans wirksame Produkte codieren (Lamouroux et al. 1980).

Obwohl mit Hilfe dieses Mutantentyps eine Fülle von neuen Daten über das Mitochondrium zustandekam, gab es zur rho^--Bildung selbst am Beginn vorliegender Untersuchungen ausser einigen Modellvorstellungen (Borst et al. 1977, Oakley et al. 1978) wenig Anhaltspunkte.

Um einen Beitrag zur Aufklärung der rho^--Bildung zu leisten, wurden in der vorliegenden Arbeit grosse Populationen von rho^--Mutanten isoliert und vergleichend untersucht. Diese rho^--Mutanten wurden erhalten

a) nach unterschiedlicher mutagener Behandlung verschiedener rho^+-Stämme,
b) durch Isolierung von in rho^--Mutanten spontan auftretenden Subklonen.

Die Bestimmung der Retention genetischer Marker in diesen rho^--Mutanten diente zur Bestimmung der zurückbehaltenen Genomsegmente, deren Lage, Länge und Endpunkte relativ zum Wildtyp(rho^+)-Genom.

Diese Analyse liefert Ergebnisse, die nicht nur Aussagen zur rho^--Bildung erlauben, sondern auch zur Lagebeziehung der Gene auf dem Gesamtgenom und einer grossen Zahl von Markern in einer Genregion.

II. Material und Methoden

1. Stämme

Stamm	Kerngenotyp	mt Genotyp	Herkunft
M12	a ilv5 trp2 ura3	$rho^+ C^S E^S O^S P^S T^R$	Kakar et al. 1964
M12/8	a ilv5 trp2 ura3	$rho^+ C^S E^S O^S P^S T^S$	Handwerker et al.1973
M12/25	a ilv5 trp2 ura3	$rho^+ C^S E^S O^S P^S T^R$	Backhaus et al. 1976
KL 14-4A	a his1 trp2	$rho^+ C^R_{321} E^S O^R_1 P^R_{454} T^R$	Wolf et al. 1973
RM 511-4A	a trp1 ural tsp25	$rho^+ E^R_{221} O^R_2 P^R_{454} T^R$	Backhaus 1976
RM 590-9D	a trp1 tsp25	$rho^+ C^R_{321} E^R_{221} O^R_1 A^R_{101} P^R_{454}$	Backhaus 1976
777-3A	α ade1 op1	$rho^+ C^S E^S O^S P^S T^S mit^+$	Kotylak et al. 1976
777-3A	α ade1 op1	$rho^+ C^S E^S O^S P^S T^S mit^-$	Kotylak et al. 1976 Schweyen et al. 1978 Bechmann et al. 1981

Folgende mit^--Mutanten fanden Verwendung:

oxi3	oxi2	oxi1	cob		
M4696	M1702	M2532	M1273	W19	M1322	M4873
M4490	M2571		M4360	G476	M1354	M4874
M4752	M4191		M5631	G2494	M1392	M4883
M5391	M6412			G5064	M1431	M4891
M6681	M7181			G5091	M2011	M4901
M5401	M7351			M171	M2022	M4942
	M7471			M191	M2491	M4953
				M561	M2499	M5001
				M591	M3013	M5020
				M611	M4111	M5025
				M771	M4216	M5071
				M1231	M4359	M9391
				M1233	M4457	M9410
				M1301	M4494	M9420
				M1321	M4615	
				M1322		
				M1354		
				M1392		

2. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von der Firma Merck/ Darmstadt bezogen.

Acrylamid	Serva/Heidelberg
Agar	Difco/Detroit und Kobe/Japan
Agarose	Seakem, Marine Colloids/USA
Bisbenzimid H33258	Riedel de Haen/ Hannover
Cycloheximid	Serva/Heidelberg
DNS (aus Heringssperma)	Boehringer/Mannheim
DNS-Polymerase	Boehringer/Mannheim
Ethidiumbromid	Serva/Heidelberg
Formamid	Fluka/Schweiz
Methylquecksilberhydroxid	Ventron/Karlsruhe
Nitrobenzyloximethylpyrimidiumchlorid	British Drughouse, Poole/England
Nitrocellulose	Schleicher & Schüll/Dassel
N,N,N',N'-Tetraäthylendiamin	Serva/Heidelberg
radioaktive Substanzen	Amersham-Buchler/Braunschweig
Rinderserumalbumin	Behring/Marburg
Restriktionsenzyme	Boehringer/Mannheim und Bethesda Research Lab./USA
Sephadex G50	Deutsche Pharmacia/Freiburg
tRNS (aus E.coli)	Boehringer/Mannheim
Yeast Extract	Difco/Detroit
Yeast Nitrogen Base	Difco/Detroit
Zymolase 6000	Kirin Brewery/Japan

3. Abkürzungen

a/α	Paarungstypen
ABM	Aminobenzyloximethyl
absol.	absolut
B	Exon: codierende Sequenzen des Cytochrom-b-Genes
bp	Basenpaare
CAP^R/CAP^S	mitochondriale Allele des RIB1-Genortes, die Resistenz /Sensitivität gegen Chloramphenicol bzw. Erythromycin bedingen
ERY^R/ERY^S	

COB	Genort, der Apocytochrom b codiert
cytRNS	cytoplasmatische RNS
dA (C,G,T) TP	Desoxy-adenosin-(cytidin,-guanosin, thymidin)5'-triphosphat
DBM	Diazobenzyloximethyl
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
I	Intron
max.	maximal
MG	Molekulargewicht
min.	minimal
mit^-/mit^Δ	mitochondriale Punktmutationen bzw. kurze Deletionen (Δ), die Atmungsdefizienz bedingen, aber funktionsfähige mitochondriale Proteinsynthese zeigen
mt	mitochondrial
mtDNS	mitochondriale DNS
mtRNS	mitochondriale RNS
NBPC	Nitrobenzyloximethylpyrimidiumchlorid
nucDNS	nucleäre DNS
OD	optische Dichte
$OLI1^R/OLI1^S$ $OLI2^R/OLI2^S$	mitochondriale Allele der ATPase-Genorte, (Untereinheiten VI und IX), die Resistenz/Sensitivität gegen Oligomycin bedingen
ω^+/ω^-	mitochondriale Allele des ω-Locus,der Polarität der Rekombination in mitochondrialen Kreuzungen bedingt
OXI1, 2, 3	Genorte der Untereinheiten II, III und I der Cytochrom-c-Oxidase
PAR^R/PAR^S	mitochondriale Allele des PAR1-Genortes, die Paromomycin-Resistenz/Sensitivität bedingen
PEG	Polyäthylenglykoll
rho^+	atmungskompetenter Wildtyp
rho^-	Makrodeletion der mtDNS begleitet von Ausfall des mt Translationssystems und Atmungsdefizienz
rho°	kompletter Verlust der mtDNS
RNS	Ribonukleinsäure
relat.	relativ
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNS	ribosomale RNS

SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard-Saline-Citrat-Puffer
syn^-	mitochondriale Mutationen, die tRNS- bzw. rRNS-Mutationen betreffen
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEB	Tris-EDTA-Borat-Puffer
Tris	Trishydroximethylaminomethan
tRNS	TransferRNS
TSM^R/TSM^S	mitochondriale Allele des TSM1-Genortes; TSM^Rist das Wildtyp-Allel, TSM^S ist der Mutationsort,der temperatursensible Atmungsdefizienz bedingt
UE	Untereinheit
WT	Wildtyp

4. Medien und Puffer

YD

Yeast Extract	1%	10g
Agar	2%	20g
Glucose	3%	30g
aqua dest.	ad 1l	

Glucose nach dem Autoclavieren steril zugeben.

YG

Wie YD, jedoch statt Glucose 3% Glycerin vor dem Autoclavieren zusetzen.

YNB

Yeast Nitrogen Base (Difco Lab.)	7g
Bacto Agar (Difco Lab.)	20g
Glucose	60 ml (50%-ige Lösung)
aqua dest.	ad 1l

Glucose steril nach dem Autoclavieren zugeben.

YG mit Antibiotika

Wie YG. Nach dem Autoclavieren zusetzen:

Phosphatpuffer pH 6.2	50mM
Glucose (ausser bei Paromomycin)	0.1%
Chloramphenicol	4g/l
oder	
Erythromycin	2g/l
oder	
Oligomycin	3mg/l
oder	
Paromomycin	2g/l

Die Antibiotika in Äthanol lösen (ausser Paromomycin: in Wasser) und dem Agar bei einer Temperatur von 50°C zufügen.

YGD

Wie YG, jedoch 0.1% Glucose nach dem Autoclavieren steril zugeben.

Flüssigmedien

Gleiche Mengen wie bei Festmedien, jedoch ohne Zusatz von Agar.

YE 10%

Yeast Extract	100g
aqua dest.	ad 1l

5% Glucose nach dem Autoclavieren zufügen.

Phosphatpuffer 1M

KH_2PO_4	1 M
Na_2HPO_4	1 M

pH durch entsprechendes Mischen der Lösungen einstellen.

TEB-Puffer

Tris	89 mM
EDTA	2,5 mM
Borsäure	89 mM

pH 8,3

TE-Puffer

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

gewünschtes pH mit HCl einstellen.

Neutralisationspuffer

Natriumchlorid	0,5 M
HCl	0,12 M
Tris-HCl pH 7,5	0,125M

20 x SSC

Natriumchlorid	3 M
Natriumcitrat	0,3 M

mit Citronensäure pH 7,2 einstellen

20 x Denhardt's

Ficoll	0,4%
Rinderserumalbumin	0,4%
Polyviylpyrrolidon (MG 360 000)	0,4%

5. Mutagenese mit Ethidiumbromid

Der atmungskompetente Wildtypstamm (KL14-4A, RM 511-4A) wird in YG-medium gezüchtet. Die Zellen werden in der frühstationären Phase geerntet, einmal mit H_2O gewaschen und in Phosphatpuffer (0,1 M; pH 6,5) aufgenommen (Titer 1-2 x 10^6 Zellen/ml). Eine Stunde lang wirkt Cycloheximid (10 µg/ml) auf die Zellsuspension, um nicht-wachsende Bedin -

gungen herzustellen. Die mutagene Behandlung beginnt durch Zugabe von EB in der gewünschten Konzentration (15 µg/ml bzw. 30 µg/ml). Nach 3h Mutagenese bei 23°C werden die Zellen mit H_2O gewaschen und entweder sofort oder erst nach Ablauf einer von Fall zu Fall unterschiedlich gewählten Segregation auf YD-Agar ausplattiert. Nach 3-5 Tagen Bebrütung (23°C) werden diese Mutterplatten auf YG überstempelt, wodurch nach Wachstum die Unterscheidung zwischen atmungskompetenten rho^+-Kolonien und atmungsdefekten petites (rho^- oder rho^o) getroffen werden kann.

6. $MnCl_2$-Mutagenese

Der Wildtypstamm wird in YG-Medium bis zum Titer von 6-8 x 10^7 Zellen/ml vorgezüchtet. Zu diesem Zeitpunkt werden die Zellen in YD-Medium, dem das Mutagen in gewünschter Konzentration (750 µg/ml bzw. 1 200 µg/ml) zugesetzt ist, auf einen Titer von 1-2 x 10^4 Zellen/ml verdünnt und bei 23°C 5-6 Tage bis zur stationären Phase inkubiert. Die Isolation der entstandenen atmungsdefekten Klone geschieht wie bei der EB-Mutagenese.

Bei Stamm RM 590-9D ist obige mutagene Behandlung bei erhöhter Temperatur von 36°C durchgeführt worden.

7. Bestimmung der temperaturabhängigen Bildung atmungsdefekter Zellen

Nach Züchtung der Zellen des temperatursensiblen Stammes (M12/30, M12/8) in YG-Medium (23°C) bis zur spätlogarithmischen Phase wird die Kultur aufgeteilt und jeweils zu einem Anfangstiter von etwa 5 x 10^5 Zellen/ml in YD-Medium überimpft. Fortan wird die eine Hälfte bei 23°C, die andere bei 36°C bebrütet. Zellvermehrung wird bei 578 nm in einem Eppendorf-Photometer verfolgt, wobei eine Zellgeneration als Verdoppelung der Extinktion definiert wird. Nach verschiedenen Zeiten werden Proben entnommen und auf YGD-Platten aufplattiert. Nach 4-5 Tagen Inkubation bei 23°C wird wie schon angegeben (5.) der Anteil atmungsdefekter Kolonien bestimmt und für die weiteren Untersuchungen isoliert.

8. Genetische Lokalisierung von rho$^-$ Mutanten mittels Kreuzungen

Haploide rho$^-$-Mutanten werden in Mikrotiterplatten in YE 10% (+ 5% Glucose) über Nacht bei 30°C gezüchtet. Genetisch definierte mit$^-$-Testerstämme werden auf YNB-Agar plattiert und die rho$^-$-Mutanten zur Kreuzung hier aufgestempelt. Nach 2 Tagen Bebrütung bei 30°C werden die Klone auf nicht-vergärbare YG-Platten überstempelt und nochmals bei 30°C weitere 3-4 Tage inkubiert. Sollten sich in der mit$^-$-Testersammlung konditionell hitze- bzw. kältesensible Mutanten befinden, so werden die YG-Platten doppelt angelegt und entsprechend bei permissiver und nicht-permissiver Temperatur inkubiert.

9. Kartierung von mit$^-$-Mutanten mittels Kreuzungen

mit$^-$-Mutanten werden (ebenso wie rho$^-$-Mutanten, s. Punkt 8) in Mikrotiterplatten gezüchtet und nun mit einer genetische charakterisierten Sammlung von rho$^-$-Mutanten gekreuzt. Um konditionelle Mutanten zu erfassen, werden die YG-Platten dreifach angelegt und bei 18°C, 23°C und 36°C bebrütet.

10. Induktion hochsuppressiver rho$^-$-Mutanten

Wildtypzellen (KL 14-4A) werden zu einem Titer von 1-2 x 10^4/ml in YD-Medium überimpft, das 30ug/ml EB enthält. Nach Erreichen der stationären Phase werden die Zellen auf YD-Platten ausplattiert. Das übliche aufwendige Verfahren, Suppressivität der erhaltenen Mutantenklone zu bestimmen, wird modifiziert:

rho$^-$-Kolonien werden in eine Mikrotiterplatte isoliert und anschliessend auf einen rho$^+$-Rasen gestempelt(Stamm 777-3A). Zum Zeitpunkt der Zygotenbildung (nach ca. 3-5h/30°C), werden die Klone auf nicht-vergärbares Substrat (YG) überstempelt. Nach zwei Tagen wird an Hand des Wachstums qualitativ Suppressivität bestimmt: volles Wachstum (Phänotyp 1) und schwächeres Wachstum (Phänotyp 2) werden beobachtet. Alle haploiden rho$^-$-Klone, die atmungskompetente Zygotenklone hervorbringen, werden als 'neutral' bezeichnet und aus den folgenden Untersuchungen ausgeschlossen. Jene haploiden petites, die zu Kolonien vom Phänotyp 2 führen, werden für die weiteren Analysen ausgewählt, denn ihr schwaches Wachstum kann als Hinweis auf hohe Suppressivität angesehen werden.

Zur quantitativen Bestimmung von Suppressivität werden die im Vortest als geeignet selektierten haploiden rho$^-$-Mutterklone noch einmal mit

dem gleichen rho^+-Tester zur Zygotenbildung gebracht und im einsetzenden Zygotenstadium werden Einzelkolonien auf Minimalagar ausplattiert (300-400 Zellen/Platte). Nach Überstempelung der gewachsenen Klone auf YG zur Unterscheidung von atmenden und nicht-atmenden Kolonien, wird Suppressivität nach Ephrussi et al. (1965) bestimmt:

$$S(\%) = \frac{(X-Y)}{100-Y} \times 100$$

X: Prozentsatz atmungsdefekter Zygotenklone in der Kreuzung
Y: Prozentsatz spontaner petites im rho^+-Elter

11. Präparation von Mitochondrien

Für die mitochondriale DNS-Präparation werden die Hefezellen (rho^- - Mutanten) in YD-Medium bis zur stationären Phase gezüchtet; für die Präparation mitochondrialer RNS (mit^--Mutanten) erfolgt die Zellaufzucht mit Galaktose als C-Quelle, um den Effekt der vollständigen Repression mitochondrialer Proteine zu umgehen (Böker et al. 1976, Holzer 1976). Die Zellen werden in der logarithmischen Phase des Wachstum geerntet, um die Ausbeute an RNS zu optimieren (Titer 4-5 x 10^7/ml).

Für die DNS-Präparation werden die Mitochondrien nach der Methode von Lang et al. (1977) isoliert, wobei die Zellen in Sorbitolpuffer (0,6M Sorbitol/ 2mM EDTA/ 10 mM Tris-HCl, pH 6,8) mit Glasperlen mechanisch aufgeschlossen werden.

Bei der Isolierung mt RNS werden die Stämme hingegen enzymatisch mit Zymolase (3 mg/g Nassgewicht) protoplastiert (Lewin et al. 1978). Die Zelltrümmer werden durch mehrere niedertourige Zentrifugationsschritte entfernt und die Mitochondrien bei 20 000 rpm (20') pelletiert. Durch wiederholtes Waschen (4-5x) lassen sich die letzteren weitgehend von cytoplasmatischer Kontamination befreien.

12. Extraktion mitochondrialer DNS

Die Lyse der Mitochondrien erfolgt in TE-Puffer (pH 7,2) unter Zugabe von 2% SDS (Noll et al. 1968) und anschliessender Inkubation bei 60°C (20') bis zur vollständigen Klärung der Suspension. Dem Lysat wird Natriumchlorid (Endkonzentration 1M) zupipettiert und das Detergens zusammen mit dem Protein über Nacht bei 4°C präzipitiert. Das ausgefallene Material wird abzentrifugiert (15 000 rpm/ 15'),

dem Überstand mit Nukleinsäuren wird Bisbenzimid (1 µg/ml, Müller et al. 1975) zugegeben und mit Natriumjodid eine Brechungszahl von 1,4295 refraktometrisch eingestellt. Durch Zentrifugation bei 40 000 rpm und 5°C (40h im Vertikalrotor bzw. 72h im Ti 60 Rotor) in Beckmann-Ultrazentrifugen (L5-50) lässt sich die AT-reiche mtDNS als obere Bande im Gradienten abtrennen. Sie wird entnommen und wegen eventuell kontaminierender nucDNS einer zweiten Zentrifugation untergen. Das Bisbenzimid wird durch Extraktion mit Isopropanol entfernt und gegen TE-Puffer (20l/ 48h) dialysiert. Das Dialysat wird mit PEG (MG 40 000) eingegengt und restliches Protein wird mit Proteinase K (100 µg/ml, 30' bei 60°C) abgedaut. In der Lösung befindliches Protein wird anschliessend mit Phenol (0,5 Volumen) denaturiert; letzteres wird wiederum durch Extraktion mit Äther (Wässerige Phase: Äther = 1:6) aus der wässerigen Phase entfernt. Durch Zugabe von 0,1 Volumen Natriumacetat (3 M) und 2,5 Volumina Äthanol (95%) lässt sich die DNS bei -20°C über Nacht fällen.
Die Menge an DNS wird spektralphotometrisch abgeschätzt, wobei einem DNS-Gehalt von 50 µg/ml eine optische Dichte von 1,0 bei 260 nm (Cryer et al. 1975) entspricht.

13. Gewinnung von mtRNS

Unter sterilen Bedingungen werden die isolierten Mitochondrien (s. Punkt 12) mit 1% SDS lysiert (Morimoto et al. 1979) und die Nukleinsäuren zum Deproteinisieren 3x mit TE-gesättigtem Phenol extrahiert. Die wässerige Phase wird mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat versetzt. DNS und RNS anschliessend mit 2,5 Volumina Äthanol (95%) über Nacht bei -20°C präzipitiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt spektralphotometrisch: einem RNS-Gehalt von 1mg/ml entspricht eine optische Dichte von 20 bei 260 nm (Rubin 1975).

14. Restriktionsverdau, Elektrophorese und Isolierung von DNS-Fragmenten aus Gelen

Es wurden die Restriktionsenzyme HpaII, HhaI, HaeIII, AluI und HinfI verwendet. Die Inkubation erfolgte in 20 µl Restriktionspuffer bei 37°C, wobei 1-2 Einheiten Enzym pro 1 µg DNS eingesetzt wurden. Die Zusammensetzung der Restriktionspuffer erfolgte nach Angaben der Hersteller. Die Reaktion wurde mit 1/10 Volumen 0,5M EDTA gestoppt und die Proben nach Zusatz von Bromphenolblau (10mM EDTA, 10 mM Tris-HCl

pH 7,4; 0,7% Bromphenolblau gesättigt mit Sucrose) elektrophoretisiert in vertikalen bzw. horizontalen Acrylamid- und Agarosegelen. Nach Anfärben der Gele mit EB-Lösung (1 µg/ml, 30') wurden diese im UV-Durchlicht mit einem "Durst-Labarator" fotografiert. Zur radioaktiven Markierung mit ^{32}P wurden die gewünschten DNS-Fragmenten nach McDonnell et al. (1977) elektroeluiert, phenolisiert (3x) und äthanolpräzipitiert.

15. Radioaktive Markierung von mitochondrialer DNS durch "nick translation"

Radioaktiver Einbau erfolgte nach Rigby et al. (1977). Es wurde jedoch auf DNase-Behandlung für das Nicken der DNS verzichtet. 0,1-0,4 µg mtDNS wurde bei 18°C über Nacht in folgendem Gemisch inkubiert: ^{32}P-dATP (spezifische Aktivität 2 000 Ci/mMol), dCTP, dTTP, dGTP je 5 µM; Puffer: 6 mM $MgCl_2$, 40 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM β-Mercaptoäthanol; DNS-Polymerase I: 1 Einheit. Ansatzvolumen: 30 µl.
Nach Beendigung der Reaktion mit 0,1 Volumen EDTA (0,5M) wurde über eine mit Säulenpuffer (TE-puffer, pH 7,5) äquilibrierte Sephadex G 100-Säule (4 ml) die markierte DNS von den nicht inkorporierten Triphosphaten abgetrennt; die gesammelten Fraktionen wurden bis zu ihrem Gebrauch bei -20°C eingefroren.

16. Übertragung von DNS aus Agarosegelen auf Nitrocellulosefilter

Der Transfer erfolgt nach der Methode von Southern et al. (1975). Das mit EB gefärbte und fotografierte Gel wird zur Denaturierung der DNS bei Raumtemperatur geschüttelt,20' bei 4°C neutralisiert und zuletzt 20' in 20xSSC äquilibriert. Das Gel wird auf zwei Lagen Whatman 3MM-Papier (in 20xSSC getränkt) gelegt und mit Nitrocellulose (vorher mit 2xSSC befeuchtet) bedeckt; auf das Filter wird 3MM-Papier gelegt und mehrere Lagen Zellstoff. Das Ganze wird mit einem Gewicht beschwert. In den ersten 1 1/2 Stunden wird alle 10' der Zellstoff gewechselt, der Transfer wird über Nacht bei 4°C fortgesetzt. Anschliessend wird das Nitrocellulosepapier kurz in 2xSSC gewaschen, zwischen 2 Lagen 3MM-Papier getrocknet und 2h bei 80°C gebacken.

17. Hybridisierung von nitrocellulosegebundener DNS mit ^{32}P-mtDNS

Der Nitrocellulosefilter wird bei 60°C vorinkubiert:
in 3xSSC, 30'
in 3xDenhardt's, 30'
in Hybridisierungslösung, 60'
Der Filter wird mit 2-3ml Hybridisierungslösung samt hitzedenaturierter radioaktiver Probe (5' Kochen, 5' Eiswasser) luftblasenfrei in Plastikfolie eingeschweisst und 16h bei 60°C inkubiert. Zum Entfernen nicht gebundener oder unspezifisch gebundener ^{32}P-DNS nach Hybridisierung wird der Filter in Hybridisierungslösung gewaschen (6 x 5', 60°C), anschliessend in 0,1% SSC (2 x 15', 60°C) + 0,1% SDS + denaturierte Träger-DNS (50 µg/ml) geschüttelt. Das Nitrocelluloseblot wird nach den Waschschritten erneut in Plastikfolie eingeschweisst und bei -70°C mit Kodak XRayOMat-Film und Verstärkerfolie (CAWO-SE-6) radioautographiert.

18. Transfer von mtRNS aus Hg-Agarosegelen auf DBM-Papier

18.1.Herstellung des ABM-Papiers

910 mg NBPC und 280 mg Natriumacetat,in 9 ml 70%-igem Äthanol gelöst, werden gleichmässig auf ein Blatt Whatman 540-Papier (18 x 27 cm) verteilt und trocken gerieben. Dieser Schritt wird zweimal mit 100%-igem Äthanol ohne Natriumacetat wiederholt. Das Papier wird nun 30' bei 60°C getrocknet, anschliessend sofort 35' bei 60°C in Alufolie gebacken. Nach zweimaligem Waschen (jeweils 20') mit H_2O wird erneut bei 60°C (2 1/2 h) getrocknet, dann zweimal mit 200 ml Benzol 30' geschüttelt. Das getrocknete ABM-Papier wird bis zum Verbrauch bei 4°C im Exsikkator aufbewahrt.

18.2.Aktivierung des ABM-Papiers

Erst kurz vor Gebrauch wird das ABM-Papier in das reaktionsfähige DBM-Papier umgewandelt. Hierzu wird es 30' bei 60°C in 200 ml 20%-igem Natriumdithionit geschüttelt, 20' in H_2O gewaschen, 20' in 200 ml 30%-iger Essigsäure und erneut dreimal mit je 200 ml H_2O gewaschen. Die Umwandlung der ABM-Gruppen in DBM-Gruppen erfolgt bei 4°C in folgender Lösung: das Papier wird 5x mit je 100 ml eiskaltem Wasser gewaschen, wobei es sich leuchtend gelb färbt. Es folgen nun zwei Waschschritte mit kaltem Phosphatpuffer. Bis zu Beginn des Transfers (höchstens

15' später) wird das Papier in eiskaltem Puffer aufbewahrt.

18.3.Transfer der mtRNS

Das Gel wird viermal je 20' lang in 500 ml Puffer (10mM Tris-HCl/ pH 7.3; 0,1% β-Mercaptoäthanol) gewaschen. Beim vierten Waschschritt wird dem Puffer 1 µg/ml EB zugesetzt; anschliessend wird das Gel gefärbt und fotografiert. Die RNS wird nun mit 50 mM NaOH (+ 0,1% β-Mercaptoäthanol) denaturiert (3x je 10') und hierauf in 0,2M Phosphatpuffer neutralisiert (Kaliumphosphatpuffer pH 5,8; Natriumjodoacetat 7mM; 2 x 15', je 200 ml). Nach zweimaligem Waschen in 25 mM Kaliumphosphatpuffer (je 10') erfolgt der Transfer bei 4°C wie unter Punkt 17 beschrieben. An Stelle von 20 x SSC wird hier das Papier in 5 x SSC (+ 0,1% SDS und 50 µg/ml E.coli tRNS) bei 4°C aufbewahrt.

19. Hybridisierung von filtergebundener RNS mit "nick translatierter" DNS

Eine Vorinkubation von mindestens 6h bei 37°C wird durchgeführt (Lösung: 33% deionisiertes Formamid, 1% Glycin, 1x Denhardt's in 6 x SSC, 1 µg/ml beschallte, hitzedenaturierte Heringspermien-DNS). Die Hybridisierung erfolgt im gleichen Puffer, jedoch ohne Zusatz von Glycin, im kleinen Volumen (abhängig von der Filtergrösse). Dazu wird radioaktiv markierte, hitzedenaturierte mtDNS zugegeben und 16-20h bei 37°C im verschweissten Plastikbeutel inkubiert.

Zum Entfernen der nicht hybridisierten bzw. unspezifisch gebundenen ^{32}P-mtDNS wird das Papier sechsmal in 0,5 x SSC (je 20') gewaschen. Das feuchte Papier wird in Plastikfolie eingeschweisst und bei -70°C mit einer CAWO-SE-6 Verstärkerfolie radioautographiert.

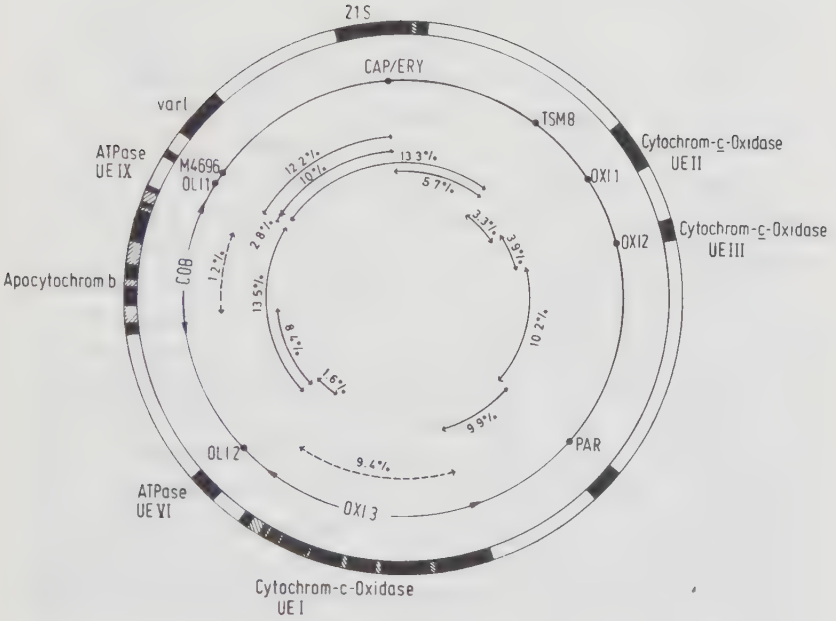


Abb. 4: Zirkuläre Karte der mtDNS von KL 14-4A

Die Abbildung stellt die zirkuläre Karte der mtDNS von Saccharomyces cerevisiae dar. Der äussere Kreis zeigt die Gene, die vom mtDNS-Molekül codiert werden entsprechend einer Zusammenstellung genetischer und physischer Daten von L.A. Grivell (1983). Bei den Genen mit Mosaikstruktur - COB, OXI3, 21S - sind die codierenden Segmente (Exons) schwarz ausgefüllt und die nicht-codierenden Teile schraffiert wiedergegeben.

Der innere Kreis bringt die angenäherten Positionen einiger im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten genetischen Marker neben den bisher bekannten ori-Sequenzen (Bernardi 1982, Review).
Die innersten Bögen führen die an Hand der rho$^-$-Population aus Exp. III ermittelten genetischen Distanzen auf. Die Distanz OXI3-PAR basiert auf Daten aus Exp. II, da hier ein am 5'-Ende liegender OXI3-Marker eingesetzt worden war. Durchbrochene Bögen geben die Distanzen im COB- und OXI3-Gen wieder, bei denen diese Ermittlung unterschätzte Werte bringt.

III. ERGEBNISSE: allgemeine Einführung

Atmungsdefekte rho^- - und rho^0-Zellen treten bei Hefestämmen spontan mit Häufigkeiten bis zu 1% pro Generation auf. Eine deutliche Erhöhung ihres Auftretens kann erzielt werden durch mutagene Agentien (Berenil, Euflavin, Ethidiumbromid - Ephrussi et al. 1950. Waring 1966, Mahler et al. 1973), durch UV-Bestrahlung (Moustacchi 1971, Deutsch et al. 1974) oder durch Anzucht von temperatursensiblen Mutanten unter nicht-permissiven Bedingungen (Weislogel et al. 1970, Handwerker et al. 1973, Bandlow et al. 1975, Backhaus et al. 1978). Diese konditionellen Mutanten stellen einen Hinweis auf eine enge Interaktion zwischen Kern und Mitochondrium im Sinne einer Einwirkung karyotischer Gene auf die Stabilität des mitochondrialen Genoms.

Aus dem breiten Spektrum der bekannten Mutagene wurden hier Ethidiumbromid (EB) und $MnCl_2$ ausgewählt. EB ist als potentes Mutagen bekannt (Waring 1966), das eine Kultur von rho^+-Zellen unter wachsenden Bedingungen beinahe vollständig in rho^0-Zellen überführt, während seine Wirkung unter nicht-wachsenden Bedingungen die Entstehung einer heterogenen rho^-/rho^0-Population zur Folge hat (Slonimski et al. 1968, Deutsch et al. 1974, Schweyen et al. 1976a). Als mögliche Interaktion von EB mit der DNA werden Interkalation (Waring 1966) und kovalente Bindung (Mahler et al. 1974) diskutiert. Seine chemische Modifikation der DNA soll eine Konformationsänderung bewirken, die die Anfälligkeit des Genoms gegenüber Nucleasen erhöht und damit Fragmentierung zur Folge hat.

$MnCl_2$ wirkt ebenso wie EB bevorzugt auf mitochondrialer Ebene. Seine Eigenschaft, rho^--Zellen zu produzieren, ist schon seit längerer Zeit bekannt (Nagai und Nagai 1958 & Nagai et al. 1961).Erst der Nachweis von Punktmutationen im mitochondrialen Genom führte dazu, dass dieses Mutagen vielfach verwendet wurde (Putrament et al. 1973 & 1975). Für seinen Wirkungsmechanismus gibt es inzwischen Hinweise, dass eine in der mitochondrialen Membran lokalisierte DNase-Aktivität durch Mn^{++}-Ionen stimuliert wird und zur Initiation des mutativen Prozesses führt (Foury 1982). Dies steht im Gegensatz zur früheren Annahme, dass Mn^{++}-Ionen mit der Funktion der mitochondrialen DNA-Polymerase interferieren (Putrament et al. 1973).

Experiment	I KL 14-4A 15 µg/ml EB Abb. 6	II KL 14-4A 30 µg/ml EB Abb. 7	III RM 511-4A 30 µg/ml EB Abb. 8	IV RM 590-9D 500 µg/ml $MnCl_2$ + 36°C Abb. 9	V RM 511-4A 250 µg/ml $MnCl_2$ Abb. 10	VI M12/WT 750 µg/ml $MnCl_2$ Abb. 11	VII M12/WT 1200 µg/ml $MnCl_2$ Abb. 12	VIII M12/8 36°C Abb. 13	IX M12/25 36°C Abb. 14
% spontaner rho^-	1%	2%	2%	1%	0.3%	0.5%	0.5%	5%	7%
% induzierter rho^-	15%	40%	44%	90%	45%	6%	70%	66%	64%
untersuchter petites	263	124	509	450	225	54	183	174	181
Anzahl geprüfter Marker	13	22	13	26	6	8	11	6	7
"einfache" Deletion	32%	60%	46%	65%	60%	76%	28%	71%	61%
"multiple" Deletion	18%	35%	6%	24%	2%	4%	6%	2%	2%
totale Deletion	48%	3%	48%	5%	36%	9%	65%	35%	22%
totale Retention	2%	2%	1%	6%	2%	11%	0.6%	1%	5%
Klontyp	Sekundärklone	Sekundärklone	Sekundärklone	Sekundärklone*	Sekundärklone*	Sekundärklone*	Sekundärklone*	Sekundärklone*	Sekundärklone*

Tab. 1: Übersicht über Herkunft der untersuchten rho^--Populationen

Wie angeführt wurden die Induktionen unter Verwendung von Ethidiumbromid (EB), Manganchlorid oder Züchtung bei nicht-permissiver Temperatur (36°C) gemacht. Bei Stamm RM 590-9D wurde $MnCl_2$ mit Wachstum bei nicht-permissiver Temperatur kombiniert.
Die Gesamtzahl (Σ) untersuchter petites umfasst rho^0- und rho^--Mutanten (evtl. auch pet^-, syn^-, mit^-); rho^- werden nach Art ihrer deletierten mtDNS charakterisiert als

- 'einfache'Deletion: Fehlen eines kontinuierlichen Segmentes des Genoms,
- 'multiple'Deletion: Fehlen von zwei (oder mehr nicht-kontinuierlichen) Segmenten auf Grund von (a) interner Deletion oder (b) Mischung zweier rho^--Populationen (vgl. Text),
- 'totale'Retention : Retention aller geprüften Segmente. Unter diesen petites können sich auch pet^-, mit^-, syn^-, ausserdem 'heteromitochondriale' rho- befinden (vgl. hierzu auch Tab. 2). Auf ihre nähere Charakterisierung ist in dieser Arbeit verzichtet worden.

1. Induktion und Charakterisierung von rho$^-$-Mutanten

Um das Problem der rho$^-$-Entstehung mit genetischen Mitteln eingehender zu studieren, wurde es für nötig befunden, eine grosse Anzahl rho$^-$-Klone zu isolieren. Da ein möglichst objektives Bild dieses Vorgangs erwünscht war - es sollte der Einfluss sowohl stamm- als auch mutagenspezifischer Faktoren ausgeschlossen werden - erfolgten die Induktionen in diversen Stämmen wie auch unter Anwendung verschiedener Noxen.

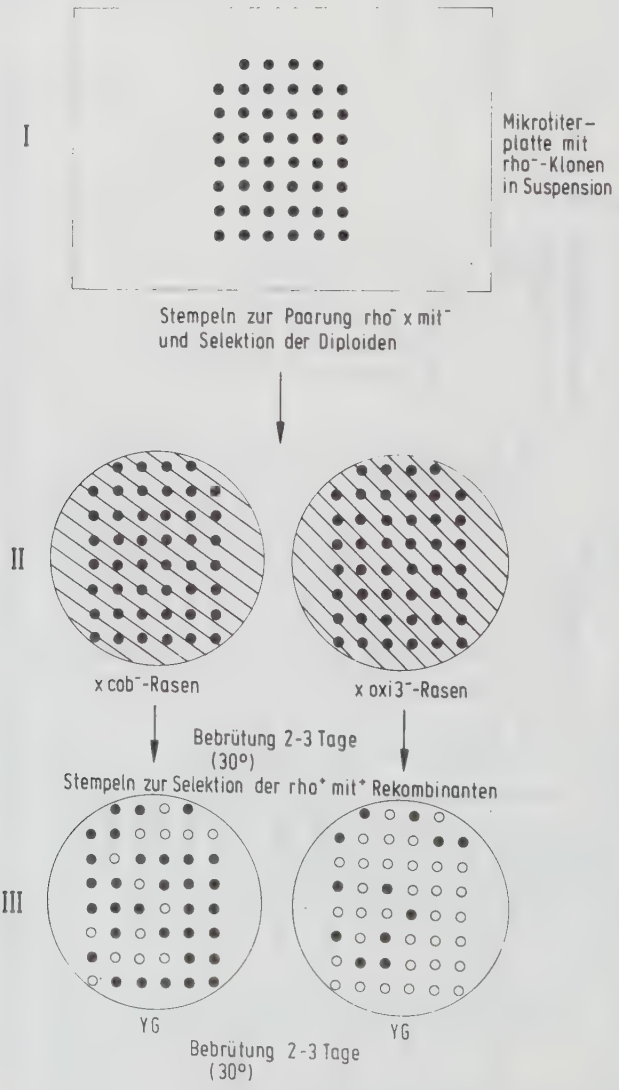
1.1. Mutagene Behandlungen

Nach Mutagenese atmungskompetenter Wildtyp-Zellen (RC; vgl. hierzu Tab. 1) werden für die sich anschliessende Analyse atmungsdefekte (RD) Kolonien isoliert. Erfahrungsgemäss führen die angewendeten mutagenen Agentien bzw. mutativen Bedingungen in erster Linie zum Verlust grosser Teile des mitochondrialen Genoms oder zu seiner kompletten Deletion, also zur Entstehung von rho$^-$-Mutanten bzw. rho^o- Mutanten. Allerdings ist nicht auszuschliessen, dass eine solche RD-Population auch mit$^-$, syn$^-$und/oder pet$^-$-Mutanten enthält, die jedoch - gegenüber rho$^-$ - in weitaus geringerer Anzahl nach Mutagenese anzutreffen sind. Während mit$^-$- und syn$^-$-Mutationen im rho$^+$-Faktor, also der mtDNS, sind, handelt es sich bei der pet$^-$-Mutation um einen karyotischen Defekt, der ebenso wie rho$^-$/rho^o, mit$^-$ und syn$^-$ zu einem Ausfall mitochondrialer Funktionen (Atmung, oxydative Phosphorylierung, Nukleotidtransport zwischen Cytoplasma und Mitochondrium u.a.) führt, so dass Wachstum der Zellen auf nicht-vergärbarem Substrat nicht möglich ist.Alle diese Mutanten bilden auf Agarplatten mit geringen Mengen vergärbarer Substrate kleinere Kolonien als mitochondrial intakte Wildtyp-Stämme. Diese Grössenunterschiede der Kolonien haben zu der Bezeichnung "petite" für die Mutanten und "grande" für den Wildtyp geführt (Ephrussi et al. 1949). Die Möglichkeiten der genetischen Differenzierung zwischen den genannten Mutantentypen wird in Tab.2 wiedergegeben.

		Reversion[3]	Atmungskompetenz von Diploiden bei Kreuzungen:		
			x $rho^{o}pet^{+}$	x $rho^{-}pet^{+}$	x $rho^{+}pet^{+}mit^{-}_{y}$
petite	pet^{-}[1] (nucleär)	+	+	+	+
	mit^{-}_{x} (mt)	+	-	+/-[2]	+
	syn^{-} (mt)	+	-	+/-[2]	+
	rho^{-} (mt)	-	-	-	+/-[2]
	rho^{o} (mt)	-	-	-	-

Tab. 2: Genetische Differenzierung zwischen den nach Mutagenese erhaltenen atmungsdefekten Klonen.

(1) bei Vorliegen rezessiver Mutanten,
(2) abhängig vom rho^{-}-Tester; Vorhandensein oder Fehlen des mit^{+}- bzw. syn^{+}-Allels und daher positives (+) oder negatives (-) Ergebnis,
(3) bei (seltener) mit^{-}- oder pet^{-}-Deletion ist keine Reversion zu erwarten.


I
Mikrotiter-
platte mit
rho⁻-Klonen
in Suspension
Stempeln zur Paarung rho⁻ x mit⁻
und Selektion der Diploiden
II
x cob⁻-Rasen
x oxi3⁻-Rasen
Bebrütung 2-3 Tage
(30°)
Stempeln zur Selektion der rho⁺ mit⁺ Rekombinanten
III
YG
YG
Bebrütung 2-3 Tage
(30°)

1.2. Nachweis der Retention mitochondrialer Marker in rho$^-$-Klonen

Der erste Schritt nach Erhalt der petites ist, sie genetisch zu charakterisieren, d.h. zu bestimmen, ob und welche mitochondrialen Marker sie noch tragen. Die pleiotrope Wirkung der rho$^-$-Mutation, die zu einem Ausfall der mitochondrialen Proteinsynthese und oxidativen Phosphorylierung führt, hat zur Folge, dass rho$^-$ die in ihnen enthaltene mitochondriale Information in den Mitochondrien nicht ausprägen können. Die Retention genetischer Information in den Mitochondrien muss daher in Kreuzungen mit rho$^+$-Zellen geprüft werden.
Soweit der zur Mutagenese verwendete Stamm Antibiotika-Resistenz-bedingende Mutationen (ANT^R) trägt, so kann deren Retention in folgender Kreuzung nachgewiesen werden:

$rho^- ANT^R \times rho^+ ANT^S \longrightarrow rho^+ ANT^R$ (1)

Retention von Wildtypallelen (mit$^+$, syn$^+$) der Gene OXI, COB, OLI sowie der rRNA- und tRNA-Gene werden in Kreuzungen

$rho^- mit^+ \times rho^+ mit_a^- \longrightarrow rho^+ mit^+$ (2)

geprüft.
Ein Beispiel solch qualitativer Tests gibt Abb. 4a.(Die molekularen Ereignisse sind in Abb.2 skizziert; s. S.4). Retention eines ANT^R-

Abb. 4a: Genetische Charakterisierung von rho$^-$-Mutanten mittels qualitativer Kreuzungsanalyse

I rho$^-$-Mutanten werden in der Mikrotiterplatte im Vollmedium (YD) über Nacht bei 30°C gezüchtet.

II Ihre Kreuzung mit Testerstämmen erfolgt durch Überstempelung aus der Mikrotiterplatte auf die jeweiligen Rasen: im angeführten Beispiel handelt es sich um mit$^-$-cob$^-$- und mit$^-$-oxi3$^-$-Rasen auf W/O-Minimalmedium zur Selektion diploider Klone.

III Nach Wachstum erfolgt Stempelung auf YG-Platten (Replica-Cross-Technik), auf denen Wachstum (●) bzw. Ausbleiben desselben (o) Rückschlüsse auf den Informationsgehalt der einzelnen rho$^-$-Mutanten erlauben.
in der Kreuzung rho$^-$ x cob$^-$ heisst es also, dass nur jene rho$^-$, die ein COB$^+$-Wildtypallel tragen, dem atmungsdefekten cob$^-$-Tester infolge von Rekombination zur Atmungskompetenz verhelfen können. Dies macht sich durch Wachstum des Klones auf nicht-vergärbarem YG-Substrat bemerkbar (●).
(Angedeutet wird weiterhin in der Abbildung ein generelles Phänomen, das bei rho$^+$ ⟶ rho$^-$-Populationen zu beobachten ist: rho$^-$, die das OXI3-Wildtypallel tragen, sind immer in der Minderzahl vertreten).

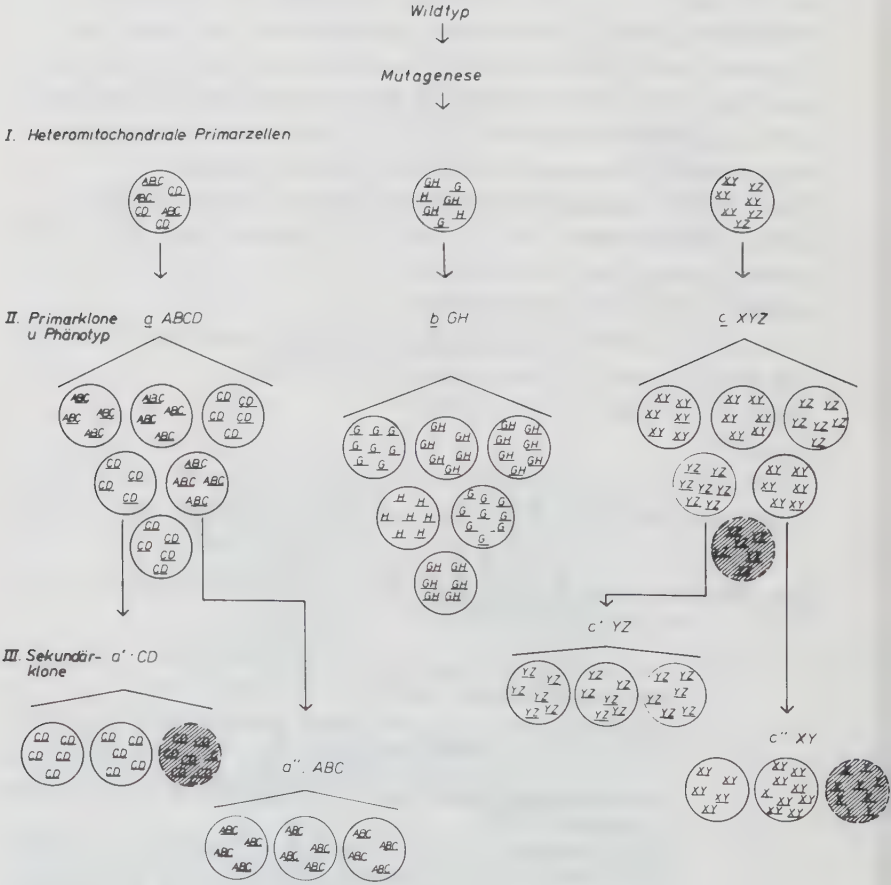


Abb. 5 Schematische Darstellung der Isolierung von Primär- und Sekundärklonen

Abb. 5: Schematische Darstellung der Isolierung von rho$^-$ Primär- und Sekundärklonen

Eine Wildtypkultur wird mutagenisiert, was zur Entstehung von mutierten Primärzellen führt, die in der Regel heteromitochondrial sind. In der Abbildung wird die in den Primärzellen verbliebene mitochondriale Information mit Buchstaben symbolisiert, z.B. ABC oder GH usw.
Durch mitotische Teilungen geht aus jeder Primärzelle ein Primärklon hervor. Die ca. 20-30 Generationen, die zwischen dem Aufbringen der Primärzelle auf die Platte und dem genetischen Test vergehen, führen zur Segregation der heteromitochondrialen rho$^-$-Population in einzelne Zellinien.
An den 3 in der Abbildung aufgeführten Primärklonen - a, b und c - wird die weitgehend abgeschlossene Segregation daran verdeutlicht, dass die einzelnen Zellen, die einen Primärklon ausmachen, bereits mitochondrial reinerbig sind. Hier ist einzufügen, dass experimentell jedoch noch nicht entschieden werden kann, ob ein Primärklon vom Phänotyp ABCD hetero- oder homomitochondrial ist. Hierüber können erst Sekundärklone Klarheit verschaffen.
Zu ihrer Isolierung werden Einzelzellen eines Primärklones ausplattiert. Die entstehenden Sekundärklone a' und a'' bzw. c' und c'' (abgeleitet aus Primärklonen a bzw. c) in der Abbildung lassen den Rückschluss zu, dass ihre jeweiligen Mutterzellen in den Primärklonen bereits homomitochondrial gewesen sein müssen.
Die schraffierten Zellen (s. Primärklone c und Sekundärklone a', c'') machen die spontan auftretende Instabilität mitochondrialer Information deutlich, die bei Subklonierung von rho$^-$, aber auch bei Züchten von rho$^-$-Zellen immer beobachtet werden kann und wohl als charakteristisches Merkmal mitochondrialer Genome angesehen werden kann.

oder mit^+-Allels (und dessen erfolgreiche Integration in rho^+-DNS) wird daran erkannt, dass ein Teil der Nachkommenschaft

a) auf YG-ANT-Platten und/oder

b) auf YG-Platten wachsen kann.

wird in Kreuzungen (1) und (2) kein Wachstum beobachtet, so wird die Deletion der geprüften Marker angenommen. Über die physische Länge der konservierten Sequenz im rho^--Partner kann mittels des genetischen Tests nicht entschieden werden.

Es sei hier auf "boundary effects" (Slonimski et al. 1978b, Michel et al.1979) hingewiesen: diejenigen Marker, die sich nahe dem physischen Ende einer konservierten Sequenz befinden, werden mit deutlich herabgesetzter Häufigkeit in das rho^+-mit^-Molekül integriert. Offensichtlich verlangt die erfolgreiche Einrekombination einen homologen Sequenzbereich zu beiden Seiten des zu integrierenden Markers (Michel et al. 1979), der eine minimale Länge nicht unterschreiten darf.

Die Populationsanalyse von rho^--Mutanten ist sowohl an Primär- als auch an Sekundärklonen durchgeführt worden (Schweyen et al. 1976a & 1978). Als Primärklone werden solche rho^--Kolonien bezeichnet, die direkt aus einer mutagen behandelten Zelle hervorgegangen sind. In der Regel wird dieser Primärklon verschiedene mtDNS-Genome enthalten, die in dessen Mutterzelle durch mutagene Behandlung von ca. 50 rho^+-mtDNS-Genomen hervorgegangen sind. Im Laufe der zur Koloniebildung führenden Teilungen werden diese rho^--Genome innerhalb weniger Zellgenerationen in verschiedene Zellinien segregieren (Abb. 5). Das Nebeneinander verschiedener Genotypen (z.B. $\underline{X^+ \cdot Y^+}$ und $\underline{Y^+ \cdot Z^+}$) kann mit genetischen Methoden der Markerretention nicht bestimmt werden.

Als Sekundärklone werden rho^--Klone bezeichnet, die von einer Zelle eines Primärklons abgeleitet werden. Die Mutterzelle eines Sekundärklones beinhaltet daher nur ein Genomsegment (z.B. $\underline{X^+ \cdot Y^+}$). Da die rho^--Genome nicht stabil sind, finden sich (mit grosser Variabilität von Klon zu Klon) innerhalb eines Sekundärklones Zellen mit kleineren rho^--mtDNS-Segmenten bzw. rho^o-Zellen. Dabei kann das ursprüngliche Genomsegment der Mutterzelle ($\underline{X^+ \cdot Y^+}$) im Extremfall durch zwei Teilsegmente ($\underline{X^+}$) und ($\underline{Y^+}$) ersetzt werden, was auch in diesem Fall bei Nachweis der Retention von $\underline{X^+}$ und $\underline{Y^+}$ zum richtigen Schluss führt, dass das ursprüngliche rho^--Genom der Mutterzelle $\underline{X^+ \cdot Y^+}$ war.

1.3. Einteilung der isolierten petites in Klassen

1.3.1. Einzeldeletionen tragende petites

An 9 Populationen von rho$^-$ wurde die Retention mitochondrialer Marker untersucht. Drei dieser Populationen wurden erhalten durch Mutagenese nicht-wachsender Zellen mit Ethidiumbromid (s.Material und Methoden). Da die Zell-Populationen nach Mutagenese mehrere Generationen gezüchtet wurden, bevor sie zur Isolierung von rho$^-$-Klonen plattiert wurden, war die Segregation der verschiedenen rho$^-$-Genome, die anfangs in der mutagen behandelten Zelle waren (primäre Mutterzelle, s.Abb. 5)weitgehend abgeschlossen; die isolierten rho$^-$-Kolonien sind als Sekundärklone zu betrachten.
Die übrigen fünf Populationen wurden durch Vermehrung von Zellen unter mutagenen und/oder nicht-permissiven Bedingungen (vgl. Tab.1) erzielt. Dabei erfolgt die Segregation auftretender rho$^-$-Genome, so dass bei Plattierung am Ende der Behandlung zumindest die weitaus überwiegende Zahl der rho$^-$-Zellen nur ein rho$^-$-Genomsegment enthalten und somit nach Abb.5 Sekundärklone bilden.
Um die in den induzierten rho$^-$-Klonen zurückbehaltene Information zu erfassen, wurden sie gemäss dem unter 1.2. geschilderten Prinzip mit einer Reihe von Testerstämmen gekreuzt.
Zur Vermeidung von Unstimmigkeiten bei der Lokalisierung von mitochondrialen Markern, die der bei Hefestämmen beobachtete Genom-Polymorphismus (Sanders et al. 1977a & b; Morimoto et al. 1979a & b) zur Folge haben könnte, ist mit isomitochondrialen mit$^-$-Testern gearbeitet worden. Letztere wurden alle im Stamm 777-3A isoliert. Ein weiterer Grund für die Wahl dieses Stammes stellte die von ihm getragene opl-Mutation dar (Kovacova et al. 1968, Kotylak et al.1977b), die mit$^-$/syn$^-$-Mutationen im Genom toleriert, jedoch den rho$^-$-Mutanten keine Überlebenschance gewährt und somit sich als ideales Selektionssystem für mit$^-$/syn$^-$ erweist.
Bei diesen Untersuchungen wurden bis zu 26 mit$^-$- und ANT^R-Tester (Tab.1; Material und Methoden) verwendet; deren Reihung auf dem Genom ist bereits in vorausgegangenen Arbeiten (Schweyen et al. 1976a und b, 1977, 1978; Slonimski und Tzagoloff 1976)festgelegt worden.
Abb. 6-14 und Tab.3 (Anhang) fassen die Ergebnisse der Retentionsanalysen zusammen. Die überwiegende Mehrheit der atmungsdefekten Klone haben - nach dieser Analyse zu schliessen

ein zusammenhängendes, in seiner Länge variierendes Genomstück verloren. Diese rho$^-$-Klone werden dem Einzeldeletionstyp zugeordnet. Wegen des groben Rasters der genetischen Analyse (max. 26 Marker in einem Genom von 75 000 bp) ist es jedoch nicht ausgeschlossen, dass das eine oder andere rho$^-$-Genom eine zweite, interne Deletion aufweist, die keinen der eingesetzten Marker betrifft.

Bei Betrachtung aller im Rahmen dieser Arbeit induzierten Klone (Abb. 6-14; Anhang) wird deutlich, dass die petite mit Einzeldeletion - je nach Induktion - den bevorzugten Typ darstellt, der bei rho$^-$-Bildung entsteht. Dies versteht sich unter Ausschluss all jener Mutantenklone, die ihre mitochondriale Information entweder komplett verloren oder allerhöchstens ein kurzes Stück zurückbehalten haben, das auf Grund fehlender Tester mit genetischen Mitteln nicht erfassbar ist; beide Typen werden im folgenden als rho^0-Mutanten gewertet. Unter diesen rho^0-Mutanten können sich natürlich hochsuppressive rho$^-$ (Bernardi 1979, Review; Bernardi et al. 1980 , Blanc et al. 1980) befinden, die meistens keine Gensequenzen mehr tragen, jedoch bei der Replikation der mtDNS eine bisher noch nicht aufgeklärte Funktion übernehmen. Für eine Differenzierung innerhalb der hier als rho^0 bezeichneten Mutanten müsste auf biochemische Analysen (DNS/DNS-Hybridisierung) oder Färbetechniken (Williamson et al. 1975) zurückgegriffen werden.

Übereinstimmend mit früheren Studien (Faye et al. 1973, Morimoto et al. 1975, Sanders et al. 1977b) erweist sich die Länge der rho$^-$-Deletion als sehr variabel: nach den vorliegenden genetischen Analysen reicht sie vom Verlust aller mitochondrialer Marker bis hin zum Verlust nur eines Markers oder weniger, eng gekoppelter Marker, z.B. in der OXI3-Region oder COB-Region (Claisse et al. 1978, Carignani et al. 1979). Unter den (seltenen) Mutanten mit Verlust nur einer Genregion mögen sich neben rho$^-$ auch mit$^-$-Deletionen verbergen, wie sie vor allem in der OXI3-Region gefunden wurden (Tzagoloff et al. 1975 Slonimski et al. 1976b). Wie Abb. 3 (S. 7) zeigt, kann mit den hier durchgeführten Kreuzungen nicht zwischen diesen Alternativen (Fall (a) und (b)) entschieden werden.

1.4. Petites vom re-arrangiertem Typ

Unter der Gesamtheit der induzierten Mutanten treten neben petites vom Einzeldeletionstyp auch solche auf, die dieser scheinbaren Gesetzmässigkeit bei der rho^--Bildung, gemeint ist die Deletion eines zusammenhängenden Genomsegmentes, nicht zu folgen scheinen (Abb. 6-14). Zwei mögliche Ursachen für die Retention von 2 oder mehr Markern, die nicht-benachbarte Genomabschnitte markieren, sind:

1) ABCDEFG → ABCGH

2) ABCDEFG → ABC + GH

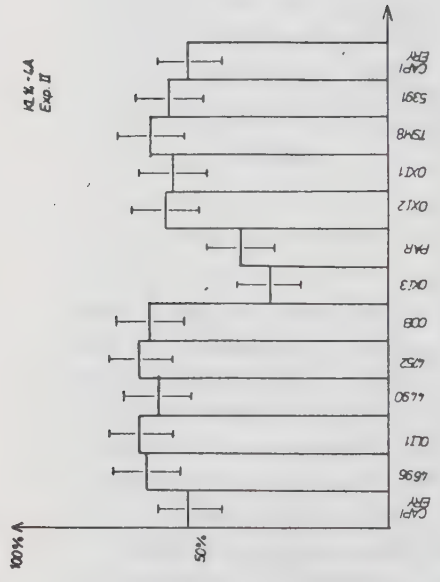
ad (1) mtDNS-Sequenzen sind molekular re-arrangiert, z.B. ABCGH durch direkte Ligierung der Segmente ABC und GH, entweder im Verlauf des primären Ereignisses der rho^--Bildung oder als sekundäres Ereignis an dem bereits etablierten Genom (interne Deletion).

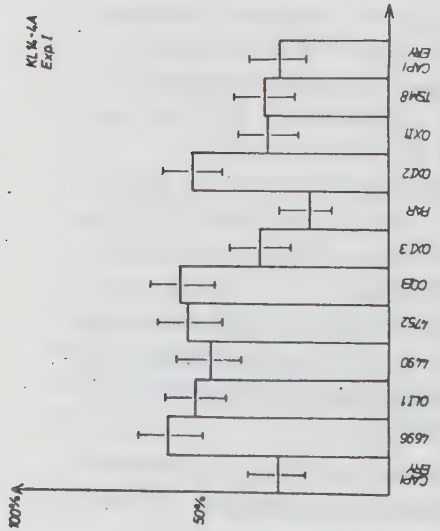
ad (2) Eine rho^--Kolonie besteht aus zwei Populationen ("heteromitochondriale" rho^-), die z.B. die Marker ABC und GH zurückbehalten haben. Diese beiden rho^--Genome mögen durch ein sekundäres Mutations- oder Rekombinationsereignis aus einer primär durch mutagene Behandlung gebildete rho^- ABCDEFG spontan hervorgegangen sein. Bei Retention langer mitochondrialer Genomsegmente sind, wie bei Schweyen et al. (1976a) gezeigt, solche sekundären Ereignisse häufig. Beispiele für den Nachweis solch heterogener Populationen sind in der vorliegenden Arbeit S.35 bis S.38 zu finden.

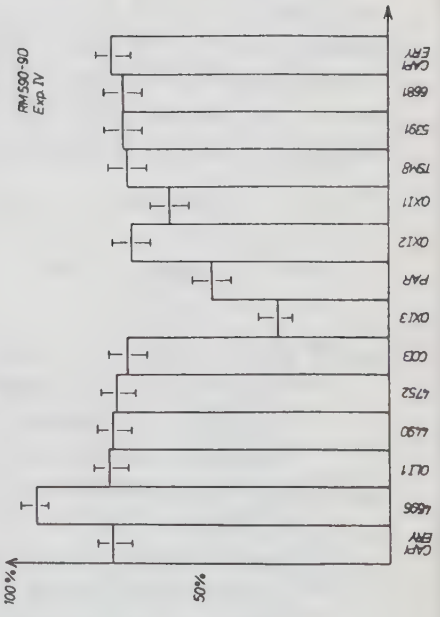
Wie die Subklonierung einzelner rho^- gezeigt hat (Fukuhara et al. 1977 und eigene Experimente: S. 46), trifft meist Fall (2) zu. Molekular rearrangierte mtDNS wurde mit grösserer Häufigkeit nur an einer Sammlung von rho^--Klonen belegt (Morimoto et al. 1975 & 1976).

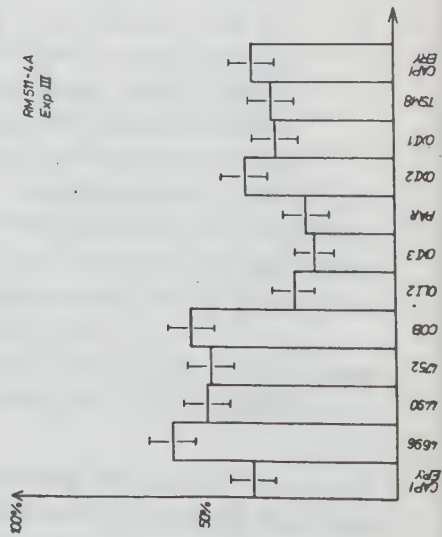
Tab.1 gibt einen zahlenmässigen Überblick zur Häufigkeit der verschiedenen, nach Mutagenese erhaltenen Klone (Einzeldeletions-, rearrangierte oder heteromitochondriale rho^-, rho^o).

Bei den rho^--Klonen, die genetische Marker zurückbehalten, überwiegt die Gruppe derjenigen mit Retention eines zusammenhängenden Stückes des Genoms (Einzeldeletion)diejenigen mit zwei oder mehr Teil-


KL%-4A
Exp. II
100%
50%
CAPI ERY
4696
OLI1
4490
4752
COB
OX13
PAR
OX12
OX11
TSM8
5391
CAPI ERY


KL%-4A
Exp. I
100%
50%
CAPI ERY
4696
OLI1
4490
4752
COB
OX13
PAR
OX12
OX11
TSM8
CAPI ERY


RM590-90
Exp. IV
100%
50%
CAPI ERY
4696
OLI1
4490
4752
COB
OX13
PAR
OX12
OX11
TSM8
5391
6681
CAPI ERY


RM5M-4A
Exp III
100%
50%
CAPI ERY
4696
4490
4752
COB
OLI2
OX13
PAR
OX12
OX11
TSM8
CAPI ERY

stücken. Bei den Stämmen M12 und RM 511-4A errechnet sich ein Faktor von 10. Bei KL 14-4A und RM 590-9D ist der Anteil der einfach deletierten rho$^-$-Genome nur um einen Faktor 2,5 grösser. Es ist keine Korrelation von Mutagen und Häufigkeit mehrfacher Deletion festzustellen.

2. Quantitative Analyse von rho$^-$-Populationen

2.1. Marker-Retention in rho$^-$-Klonen

Tab.3 (Anhang) und Abb. 15 fassen die relativen Retentionshäufigkeiten von mindestens 10 Markern zusammen, die in 4 rho$^-$-Populationen (Abb. 6-14; Exp. I-IV) studiert wurden.
Es wird deutlich (vgl. Abb. 6-14), dass - unabhängig von der Herkunft einer rho$^-$-Population - die Retentionshäufigkeit der verschiedenen mitochondrialen Genomsegmente differiert: hohe Retentionswahrscheinlichkeit haben die Segmente M4696-OLI1-M4490-M4752-COB und CAP/ERY- TSM-OXI1-OXI2; geringe Retentionswahrscheinlichkeit hat die OXI3-Region mit den Nachbarregionen PAR und OLI2.
Diese geringe Retention von OXI3-Markern (und den Nachbar-Markern) ist in allen Populationen zu beobachten (s. Abb. 16. In dieser Abbildung ist die relative Retentionshäufigkeit der vier Marker aufgeführt, deren Retention in allen 9 rho$^-$-Populationen geprüft worden sind).
Eine nicht-quantitativ erfasste Beobachtung macht den bevorzugten Verlust der OXI3-Region noch deutlicher.
Bei Coretention der COB- und OXI3-Region (oder der OXI2- und OXI3-Region) werden meist viele Rekombinanten in der Kreuzung rho^-_a x cob$^-$ (bzw. rho^-_a x oxi2$^-$), aber wenig Rekombinanten in der gleichen Kreuzung rho^-_a x oxi3$^-$ beobachtet. Daraus ist zu schliessen, dass ein rho$^-$-

Abb. 15: Marker-Retention der rho$^-$-Populationen aus Experimenten I-IV (vgl. hierzu auch Tab. 1 und 3)

Die in Experimenten I-IV beobachteten Retentionshäufigkeiten werden als Blockdiagramm widergegeben. Während die Ordinate die Retentionshäufigkeit (VB=95%) aufzeigt, stellt die Abszisse das mitochondriale Genom mit seiner Aufeinanderfolge von Genorten bzw. ihren genetischen Markern dar. In den Fällen, in denen mehrere Marker eines Genortes untersucht wurden - z.B. COB - ist aus den nur wenig variierenden Werten die mittlere Retentionshäufigkeit errechnet und eingetragen worden.

rho⁻ x-D3: $OXI3^{+}PAR^{+}OXI2^{+}OXI1^{+}$

Σ 122

OXI1	OXI2	PAR	OXI3	Klone	Häufigkeit
+	+	+	–	42	34%
+	+	–	–	13	11%
–	–	+	–	67	55%
+	+	+	+	0	1%

rho⁻ x-F6: $OXI1^{+}OXI2^{+}PAR^{+}OXI3^{+}OLI2^{+}$

Σ 138

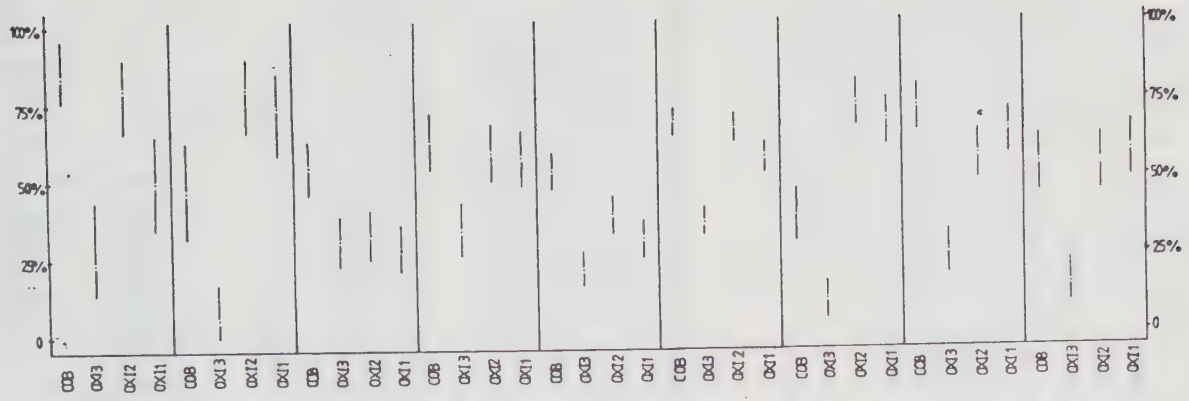
OXI1	OXI2	PAR	OXI3	OLI2		
+	+	+	–	–	17	12%
+	+	–	–	–	35	25%
–	+	+	–	–	9	7%
–	–	+	–	–	35	25%
–	+	–	–	–	15	11%
+	–	–	–	–	24	17%
–	–	+	+	+	1	0.7%
–	–	+	+	–	1	0.7%
–	–	–	+	–	1	0.7%
+	+	+	+	+	0	1%

rho⁻ A31: $OXI3^{+}PHO^{+}OLI2^{+}COB^{+}$

Σ 65

OXI3	PHO	OLI2	COB		
–	–	–	+	45	69%
–	–	+	–	5	8%
–	–	+	+	12	19%
+	–	–	–	2	3%
+	+	+	–	1	2%
+	+	+	+	0	1%

Tab. 4: Verfolgung der Marker-Retention bei Subklonierung von rho⁻ (schematisch hier als Balken dargestellt), die OXI3 zusammen mit anderen mitochondrialen Markern aufweist.



	M12/WT 49 Exp.VI	M12/WT 65 Exp.VII	KL 14-4A 138 Exp.I	KL 14-4A 120 Exp.II	RM 511-4A 265 Exp.III	RM 590-9D 426 Exp.IV	RM 511-4A 150 Exp.V	M12/8 143 Exp.VIII	M12/25 120 Exp.IX
COB	88% (76-96)	47% (32-63)	55% (46-63)	63% (54-72)	53% (47-59)	69% (64-73)	39% (30-47)	73% (65-80)	54% (45-63)
OXI3	24% (14-39)	6% (1-17)	31% (23-39)	34% (26-43)	21% (16-27)	36% (32-41)	11% (6-17)	26% (19-33)	15% (9-23)
OXI2	80% (66-90)	80% (66-90)	33% (25-41)	59% (50-68)	39% (33-45)	67% (62-71)	74% (67-82)	57% (49-65)	54% (45-63)
OXI1	50% (35-65)	74% (59-85)	28% (21-36)	57% (48-66)	31% (25-37)	57% (52-62)	69% (61-76)	65% (57-72)	58% (49-67)

Abb. 16: Retentionshäufigkeiten (VB 95%) der Gene COB, OXI3, OXI2 und OXI1, die in den in Tab. 2 aufgeführten rho$^-$-Populationen untersucht wurden.

Klon eine viel geringere Anzahl von Genomsegmenten OXI3 beinhaltet als Genomsegmente COB. (Durch Kontrollen ist sichergestellt, dass die Paarungswahrscheinlichkeit in beiden Kreuzungen vergleichbar gut war). Eine direktere Bestimmung der Retention von COB und OXI3 bzw. OXI2 und OXI3 in den Zellen einzelner rho^--Klone wurde dadurch erreicht, dass solche Klone suspendiert und Einzelzellen zu Subklonen herangezüchtet wurden. Die Bestimmung der Marker-Retention in diesen Subklonen bestätigt den Befund, dass rho^--Klone mit Co-retention von OXI3 und COB bzw. OXI3 und OXI2 in den meisten Fällen - neben mehr oder wenigen vielen Zellen des Typs COB^+ $OXI3^+$ und $OXI2^+$ $OXI3^+$ - weit bevorzugt Zellen des Typs COB^+ $OXI3^0$ bzw. $OXI2^+$ $OXI3^0$ enthielten (vgl. Tab.4). Schätzungsweise ist also die Häufigkeit von $OXI3^+$-Genomsegmenten in einer rho^--Population um den Faktor $\gg 10$ geringer als die entsprechende Häufigkeit von COB^+ bzw. $OXI2^+$.

2.2. Verteilung von rho^--Endpunkten auf dem mitochondrialen Genom

Als zweiter Parameter zur Charakterisierung der rho^--Mutation wird neben der Retention der genetischen Marker die Häufigkeit der Endpunkte der rho^--mtDNS in rho^--Populationen herangezogen. Es soll dadurch festgestellt werden, ob rho^--Genomsegmente bevorzugt in bestimmten Bereichen des mitochondrialen Genoms oder eher statistisch verteilt an vielen Punkten enden.
Zu dieser Bestimmung der Endpunkthäufigkeiten wird untersucht, wieviele rho^- in einem Genomabschnitt - beispielsweise die Marker B und C tragend (Abb. 17) - Marker B enthalten, C aber nicht mehr

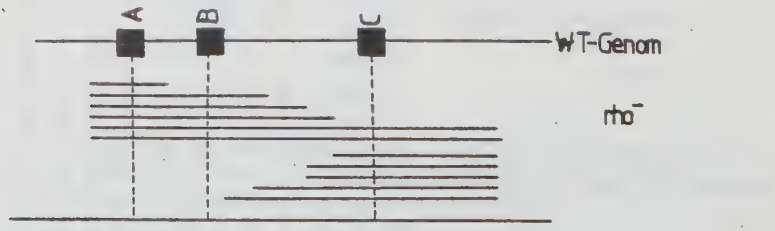


Abb. 17: Schematische Darstellung zur Bestimmung der rho^--Endpunkte (Erläuterungen im Text).

Bereich	bp	Häufigkeit absol.	relat.	Häufigkeit pro 1 000 bp	
CAP/ERY - M4696	10 000	51	37%	3,7%	
M4696 - OLI1	1 100	20	14%	12,7%	
OLI1 - M4752	1 000 max.	10	7%	7 %	10%[1]
	500 min.			14 %	
M4752 - COB/B6[c]	2 500 max.	27	20%	8%	9%[1]
	2 000 min.			10 %	
COB/B6[c] - COB/B1[c]	6 500 ca.	16	12%	1,8%	
COB/B1[c] - OXI3[a]	9 300	68	49%	5,3%	
OXI3[a] - PAR	16 600	33	24%	1,4%	
PAR - OXI2	12 000	52	38%	3,2%	
OXI2 - OXI1	4 500	47	34%	7,1%	
OXI1 - TSM	3 700	24	17%	4,6%	
TSM - CAP/ERY	7 000	42	30%	4,3%	
				Mittel: 5,7%	

Tab. 5a: Endpunkthäufigkeiten, Experiment I

Bereich	bp	Häufigkeit absol.	relat.	Häufigkeit pro 1 000 bp	
CAP/ERY - M4696	10 000	16	13%	1,3%	
M4696 - OLI1	1 100	6	5%	4,5%	
OLI1 - M4752	1 000 max. 500 min.	0	-	-	
M4752 - COB/B6	2 500 max. 2 000 min.	10	8%	4 %	
COB/B6 - COB/B1	6 500 ca.	9	7%	1,1%	
COB/B1 - cob/M9410	1 000 ca.	2	2%	2 %	
cob/M9410-OXI3[a]	10 300 max. 9 300 min.	27	22%	2,1% 2,4%	2,3%[1]
OXI3[a] - OXI3[b]	12 000	15	12%	1 %	
OXI3[b] - PAR	4 600	15	12%	2,6%	
PAR - OXI2	12 000	22	18%	1,5%	
OXI2 - OXI1	4 500	7	6%	1,3%	
OXI1 - TSM	3 700	9	7%	1,9%	
TSM - CAP/ERY	7 000	11	9%	1,3%	
				Mittel: 2,1%	

Tab. 5b: Endpunkthäufigkeiten, Experiment II

Bereich	bp	Häufigkeit absol.	relat.	Häufigkeit pro 1 000 bp	
CAP/ERY - M4696	10 000	86	32 %	3,2%	
M4696 - M4490*	1 100	21	7,9%	7,2%	
M4490* - M4752	1 000 max. 500 min.	0	-	-	
M4752 - COB/B6[c]	2 500 max. 2 000 min.	25	9,4%	3,8% 4,7%	4%[1]
COB/B6[c] - COB/B1[c]	6 500 ca.	9	3,4%	0,5%	
COB/B1[c] - OLI2	7 300	72	27,2%	3,7%	
OLI2 - OXI3[a]	2 000	10	3,8%	1,9%	
OXI3[a] - OXI3[b]	12 000	10	3,8%	0,3%	
OXI3[b] - PAR	4 600	55	20,8%	4,5%	
PAR - OXI2	12 000	72	27,2%	2,3%	
OXI2 - OXI1	4 500	30	11,3%	2,5%	
OXI1 - TSM	3 700	20	7,5%	2,0%	
TSM - CAP/ERY	7 000	50	18,9%	2,7%	
				Mittel: 2,9%	

Tab. 5c: Endpunkthäufigkeiten, Experiment III

Bereich	bp	Häufigkeit absol.	relat.	Häufigkeit pro 1 000 bp	
CAP/ERY - M4696	10 000	130	30,5%	3,1%	
M4696 - OLI1	1 100	36	8,5%	7,7%	
OLI1 - M4752	1 000 max.	18	4,2%	4,2%	6 %
	500 min.			8,4%	
M4752 - COB/B6[c]	2 500 max.	26	6,1%	2,4%	2,8%
	2 000 min.			3,1%	
COB/B6[c] - COB/B1[c]	6 500 ca.	14	3,3%	0,5%	
COB/B1[c] - M9410	1 000 ca.	1	0,2%	0,2%	
M9410 - OXI3[a]	10 300 max.	110	25,8%	2,5%	2,7%
	9 300 min.			2,8%	
OXI3[a] - OXI3[b]	12 000	17	4 %	0,3%	
OXI3[b] - PAR	4 600	73	17,1%	3,7%	
PAR - OXI2	12 000	80	18,8%	1,6%	
OXI2 - OXI1	4 500	32	7,5%	1,7%	
OXI1 - TSM	3 700	31	7,3%	2,0%	
TSM - CAP/ERY	7 000	111	26,1%	3,7%	
				Mittel: 2,8%	

Tab. 5d: Endpunkthäufigkeiten, Experiment IV

Tab. 5a-d: Endpunkthäufigkeiten von rho$^-$ im mitochondrialen Genom

a Getesteter Marker befindet sich nahe dem 3'-Ende des OXI3-Genes,

b Getesteter Marker befindet sich nahe dem 5'-Ende des OXI3-Genes,

c Marker im ersten (B1) und im letzten (B6) Exon des COB-Genes,

* bei der vorliegenden rho$^-$-Population aus Stamm RM 511-4A, der das OLI1^S-Allel trägt, wird M4490 als Marker für das OLI1-Gen gewählt,

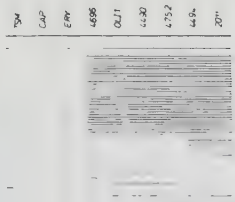
1 die angenäherte physische Position von Mutante M4752 und die vorliegende Deletion bei M9410 bedingen die Betrachtung von maximalen und minimalen Abständen in diesen Teilsegmenten. Zusätzlich wird hier noch die mittlere Endpunkthäufigkeit angeführt.

und umgekehrt (Genotypen B^+C^o bzw. B^oC^+, in der Abbildung sind dies 3 bzw. 5 Klone). Alle rho^-, die diese Forderung erfüllen, haben die Termini ihres zurückbehaltenen mtDNS-Segmentes im Bereich B - C lokalisiert (= 8 rho^- in Abb. 17) und dienen der Kalkulation der Endpunkthäufigkeiten für Genomabschnitt B - C.

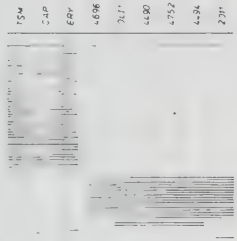
Für die Analyse werden petites vom Einzeldeletionstyp aus den Induktionen von KL 14-4A (Exp. I und II), RM 511-4A (Exp. III) und RM 590-9D (Exp. IV) herausgegriffen (vgl. hierzu Tab.3); die übrigen Induktionen (M12: Exp. VI, VII; RM 511-4A: Exp. V; M12/8: Exp. VIII; M12/25: Exp. IX) werden ausgeschlossen, da bei ihnen jene Marker, die dem OXI3-Genort benachbart liegen - wie beispielsweise OLI2 auf der COB-Seite und PAR auf der OXI2-Seite - in der Retentionskartierung nicht untersucht worden sind. Doch lässt sich auch unter diesen hier ausgenommenen Populationen im wesentlichen die gleiche Tendenz in der Lokalisation der rho^--Endpunkte feststellen.

In Tab. 5a-d sind die relativen Endpunkthäufigkeiten der untersuchten petites (die Daten stammen aus Abb. 6-14) zusammen mit den physischen Distanzen zwischen den verwendeten Markern aufgeführt. Die Endpunkthäufigkeiten variieren stark; es besteht eine positive Korrelation zwischen Endpunkthäufigkeit und Abstand der betrachteten Marker: im Segment zwischen OXI3 und COB, die ca. 10 kb umfasst, sind mehr Termini der rho^--mtDNS zu finden als beispielsweise zwischen OXI3 und OLI2, die ungefähr 2 kb (Hensgens et al. 1983a) voneinander entfernt sind bzw. Segment OXI2 - OXI1 (ca. 4,5 kb), die beide also einen kürzeren Bereich darstellen.

Dieser Sachverhalt einer auf den ersten Blick sichtbaren Korrelation zwischen Häufigkeit und Markerdistanz legt die Bestimmung einer mittleren Endpunkthäufigkeit pro 1000 bp nahe. Sie zeigt auf, dass in keinem der geprüften Genomsegmente die besagten Endpunkte von rho^- mit vom Mittel extrem stark abweichender Häufigkeit vorkommen. Die geringsten Werte zeigen die COB- und OXI3-Region, gefolgt vom OXI2-OXI1-TSM-Segment. Die insgesamt geringe Retention von OXI3 mtDNS-Sequenzen in rho^- lässt eine deutlich geringere Häufigkeit von Endpunkten in diesem Gen erwarten. Die geringe Häufigkeit im COB-Gen und im Segment OXI2-OXI1-TSM sind nicht in gleicher Weise zu erklären. (Eine mögliche Erklärung für die geringere Endpunkthäufigkeit in diesen Segmenten wird in der Diskussion gegeben).



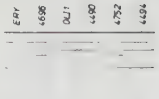
G11
TSM*CAP*ERY*4696*OLI1*4490*4752*4494*20M*



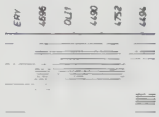
G11-1
TSM*CAP*ERY*4696*OLI1*4490*4752*4494*20M*

G11-1-2
4696*OLI1*4490*4752*4494*20M*

G11-1-2
4696*OLI1*4490*4752*

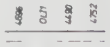


H01
ERY*4696*OLI1*4490*4752*4494*

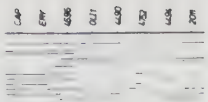


H01-1
ERY*4696*OLI1*4490*4752*4494*

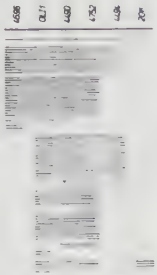
H01-2
4696*OLI1*4490*4752*



H01-4
4696*OLI1*4490*4752*

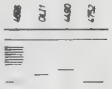


G01
CAP*ERY*4696*OLI1*4490*4752*4494*20M*



O.21
4696*OLI1*4490*4752*4494*20M*

O.22
4696*OLI1*4490*4752*4494*



H.21
4696*OLI1*4490*4752*

2.3. Marker-Retention und mtDNS-Endpunkte in rho$^-$-Subklonen

Die bisher dargestellten Ergebnisse wurden an rho$^-$-Sekundärklonen erzielt, die nach mutagener Behandlung von rho$^+$-Zellen aufgetreten waren. Deren rho$^-$-mtDNS-Segmente sind wahrscheinlich in der Mehrzahl durch mutative Ereignisse an rho$^+$-DNS entstanden (vgl. Abb.1, rho$^+ \longrightarrow$ rho$^-$); ein nicht überprüfbarer Anteil dieser rho$^-$-mtDNS-Segmente mag bis zum Zeitpunkt der Untersuchung schon nachfolgende Ereignisse der Segmentverkürzung erfahren haben ($rho^-_{X+Y+Z+} \longrightarrow rho^-_{X+Y+Zo}$).
Um ausschliesslich Populationen solcher durch sekundäre Verkürzung entstandenen rho$^-$-mtDNS-Segmente zu erhalten, wurden von mehreren der oben untersuchten rho$^-$-Sekundärklonen jeweils eine Reihe von Subklonen isoliert. Dazu wurden z.B. Zellen einer rho$^-$ des Genotyps $X^+Y^+Z^+$ ausplattiert und zu Einzelkolonien herangezüchtet. Die Marker-Retention dieser Kolonien wurde geprüft. Diejenigen Kolonien, die im Vergleich zum Mutterklon den Verlust von einem oder mehreren Markern aufwiesen (rho^-_{X+Y+Zo}, rho^-_{XoYoZ+} usw.), wurden abisoliert.

2.3.1. Subklone im Genomsegment TSM-CAP/ERY-M4696-OLI1/M4490-M4752-COB

Abb. 18 gibt die Ergebnisse der Marker-Retention in Subklonen wieder, die spontan in 11 Mutterklonen auftraten, deren mtDNS ein Genomsegment

Abb. 18: Marker-Retention in spontanen Subklonen des Genomsegmentes TSM-CAP/ERY-M4696-OLI1/M4490-M4752-COB

Die Abbildung zeigt das Ergebnis von Subklonierungsexperimenten an 11 rho$^-$-Mutanten - G11, G11-1, G11-1-2, H81, H81-1, H81-2, H81-4, G81, D21, D22, H21 - aus dem oben genannten Genombereich. Das in der jeweils untersuchten rho$^-$ enthaltene Genomsegment wird mit der Aufeinanderfolge seiner genetischen Marker als Querbalken dargestellt. Bei allen Subklonen handelt es sich um spontan entstandene Mutanten. Ihre Isolierung soll im folgenden am Beispiel von G11 demonstriert werden.
rho$^-$ G11 wurde auf Einzelkolonien ausplattiert und diese durch Kreuzung mit geeigneten Testern (vgl. hierzu auch Abb.2) auf ihren mitochondrialen Informationsgehalt hin überprüft. Neben rho$^-$ vom Ausgangstyp (mit ← gekennzeichnet) führte diese Vorgehensweise zu einer Reihe von Subklonen, die mit unterschiedlichster Häufigkeit auftreten.
Die überwiegende Anzahl der Mutanten hat ein kontinuierliches Genomsegment zurückbehalten. Dies gilt auch für die übrigen rho$^-$ - Familien. Mehrfach deletierte rho$^-$ -Subklone sind zu beobachten, stellen jedoch eindeutig eine Minoritätsklasse dar. Zudem hat ihre gelegentliche Überprüfung gezeigt, dass es sich um heterogene rho$^-$ - Populationen handelt und nicht um molekular rearrangierte mtDNS-Sequenzen.

Marker	Anzahl untersuchter Klone	Häufigkeit absol.	relat.
TSM	112	48	43% (33-53)
CAP/ERY	136	54	40% (32-49)
M4696	320	177	55% (50-60)
OLI1	320	182	57% (52-62)
M4490	320	183	57% (52-62)
M4752	320	178	56% (51-61)
cob-M4494	287	108	38% (32-44)
cob-M2011	219	63	29% (23-36)

Tab. 6: Retentionshäufigkeiten im Genomsegment TSM-CAP/ERY-M4696-OLI1/M4490-M4752-COB

Teilsegment	Länge (kb)	Gesamtzahl untersuchter Klone	Häufigkeit absol.	Häufigkeit relat.	Häufigkeit pro 1 kb
TSM-CAP/ERY	2,0	112	3	3% (0-8)	1,5%
CAP/ERY-M4696	6,0	136	116	85% (78-90)	14 %
M4696-OLI1	1,1	320	131	41% (35-47)	37 %
OLI1-M4752	1,0 max.	320	6	2% (1-4)	2 %
M4752-cob/M4494	2,0 min.	287	90	31% (26-37)	16 %
cob/M4494-cob/M2011	3,0	219	40	18% (13-24)	6 %
					Mittel:13 %

Tab.7: Endpunkthäufigkeiten im Bereich TSM-CAP/ERY-M4696-OLI1/M4490-M4752-COB

von max. 10 000 bp mit den Markern TSM, CAP/ERY, M4696, OLI1/M4490, M4752 und COB (oder Teile davon) umfasste. Die Häufigkeit des Auftretens solcher Subklone (und deren rho^{o}-Subklone) ist von Klon zu Klon verschieden wie dies Abb. 18 entnommen werden kann.
Tab.6 gibt die Häufigkeit der Retention verschiedener Marker in Subklonen wieder. Sie zeigt eine leichte Bevorzugung der Region OLI1 und der ihr benachbarten Marker im Vergleich zu TSM/CAP auf der einen und COB auf der anderen Seite. Dies entspricht in etwa den Befunden, die an den durch $rho^{+} \longrightarrow rho^{-}$-Mutation entstandenen Sekundärklonen erhoben wurden (Abb. 6-14 und Tab.3).
Sehr viel deutlicher ausgeprägt sind die Unterschiede der Endpunkthäufigkeiten in den 6 geprüften Teilsegmenten (Tab.7): nach Berücksichtigung der unterschiedlichen Längen differieren die für die Teilsegmente gefundenen Häufigkeiten maximal um den Faktor 10; die Teilsegmente M4696-OLI1 und M4752-cob/M4494 (3'-Ende der COB-Region) zeigen die grössten Häufigkeiten. Als weiteres Phänomen ist bemerkenswert, dass die Mehrzahl der Subklone (77%) einen Endpunkt im gleichen Segment wie der Mutterklon haben; möglicherweise bewahren sie (molekular gesehen) einen Endpunkt der Mutterklon-DNS und gewinnen nur einen neuen Endpunkt nach dem Schema

Mutterklon A.B.C.D.E.F.G.H.I.J.K.

A.B.C.D.E.

A.B.C.D.E.F.G.

Subklone I.J.K.

F.G.H.I.J.K.

hinzu.

2.3.2. Subklone im Gen COB

Die zweite Serie der Untersuchungen beschäftigt sich mit rho^{-}-Subklonen nur eines Genes, des Mosaikgenes COB. Auf dessen Gesamtlänge von 7 170 bp (Exons 1 bis 6 und 5 Introns) sind 43 cob^{-}-Markergruppen verteilt, deren Aufeinanderfolge durch Analyse von rho^{-}-Sekundärklonen und deren Subklonen bestimmt werden (Abb. 19 und Kapitel 6).

M 4457 (1)
M 5020 (2)
M 591 (3)
M 4883 (4)
M 2499 (5)
M 4874 (6)
M 1231 (7)
M 5071 (8)
M 771 (9)
M 1322 (10)
M 4901 (11)
M 611 (12)
G 5064 (13)
M 1301 (14)
M 4873 (15)
M 4942 (16)
M 4111 (17)
M 2491 (18)
M 5001 (19)
M 1233 (20)
M 2022 (21)
M 561 (22)
M 4216 (23)
M 2011 (24)
G 5091 (25)
M 1392 (26)
(27)
M 3013 (28)
M 1321 (29)
M 5025 (30)
M 191 (31)
G 476 (32)
M 4353 (33)
M 1431 (34)
W 19 (35)
G 2494 (36)
(37)
M 4953 (38)
M 1354 (39)
M 171 (40)
M 4891 (41)
M 4615 (42)
M 4494 (43)

Abb. 19: Die Gesamtheit der im COB-Gen trennenden rho$^-$-Klone

Die Abbildung gibt das COB-Gen als Balken schematisiert wider, in den die Exon (B1 - B6) und die Introns (I1 - I5) eingezeichnet sind. Es sei hier eingefügt, dass das Mini-Exon B2 auf Grund von Sequenzdaten nachgewiesen wurde.
Die genetische Analyse mittels rho$^-$-Klone (Kapitel 6 dieser Arbeit) liess die vorhandenen cob$^-$-Marker 43 Markergruppen zuordnen.
In der Abbildung wird jede Markergruppe werden die Markergruppen durch die in Klammern stehenden Zahlen - 1 bis 43 - angegeben und durch eine Mutante repräsentiert, z.B. Gruppe 1 durch M4457 bzw. Gruppe 28 durch M3013. Markergruppen 27 und 37 sind nicht durch Mutanten, sondern auf Grund von biochemischen Daten charakterisiert worden.
Die horizontalen Linien stellen rho$^-$-Klone dar, die das komplette COB-Gen (ein solcher Klon ist aufgeführt) oder Teile davon zurückbehalten haben.
Bei dieser Betrachtung handelt es sich in erster Linie um die Endpunkthäufigkeiten der rho$^-$ im COB-Gen (vgl. Text), d.h. beide Enden eines rho$^-$-Klones werden in die Kalkulation einbezogen. Dies hat zur Folge, dass alle rho$^-$, die (a) im COB-Gen beginnen und enden und (b) im COB-Gen beginnen und laut genetischer Untersuchungen mit dem COB-Gen enden, doppelt aufgeführt sind.

Die Gesamtzahl untersuchter Klone beträgt 140. Mit Ausnahme von 2 Klonen (nicht in Abb. 19 aufgeführt) fügen sich alle Sekundärklone und Subklone in die in Abb. 19 wiedergegebene Karte.

Die Marker-Retention ist an diesen rho$^-$-Klonen mehrfach geprüft worden; zeigten die Ergebnisse die Möglichkeit rearrangierter rho$^-$-mtDNS oder einer Mischung zweier Populationen, so wurden diese rho$^-$-Klone erneut durch Isolierung und Analyse von Subklonen geprüft. So konnten schliesslich nur zwei von 140 Klonen als rearrangiert erkannt werden. Da die Zahl von geprüften cob$^-$-Mutationsorten sehr gross war (min. 43, mittlere Distanz 200 bp), dürfte die Anzahl unentdeckter, rearrangierter Klone recht klein sein. Daraus ist zu schliessen, dass selbst bei Subklonen rho$^-$ mit molekular rearrangiertem Genomsegment sehr selten sind.

In den weiter oben dargestellten Untersuchungen (Kapitel 2) wurde der Anteil gemischter oder mehrfach deletierter rho$^-$ sehr viel höher angesetzt (vgl. Abb. 6-14, Anhang). Wie aber bereits erwähnt (Kapitel 2), erwiesen sich bei gelegentlich durchgeführter Analyse die meisten dieser rho$^-$ als aus zwei Populationen zusammengesetzt und nicht als molekular rearrangiert. Es darf also festgestellt werden, dass solche rearrangierten mtDNS-Moleküle nach den hier benutzten Methoden der rho$^-$-Mutagenese und Subklonierung selten auftreten, unabhängig davon, ob die COB-Region oder andere Segmente des Genoms zurückbehalten sind.

Das COB-Gen bietet den Vorteil bekannter physischer Längen der Introns und Exons (DNS-Sequenzierung: Nobrega & Tzagoloff 1980a, Lazowska et al. 1980 und Schmelzer: persönl. Mitteilung) und der Zuordnung der genetischen Marker des Genes (phänotypische Analyse von cob$^-$-Mutanten: Bechmann et al. 1981, Sequenzanalyse: Jacq et al. 1982, Weiss-Brummer et al. 1982, Schmelzer et al. 1982 und persönl. Mitteilung, Anziano et al. 1982).

Wie Abb. 19 zeigt, sind die meisten Markerpaare nur durch wenige rho$^-$ getrennt. Eine Häufung der Endpunkte ergibt sich nur zwischen Gruppen 22 und 23, Gruppen 26 und 27, sowie 36 und 37. In der physischen Karte des COB-Genes zeigen diese Marker die grössten Abstände, nämlich ca. 440 bp, 1 500 bp und 730 bp. Sie markieren Intronsequenzteile, in denen bisher keine cob$^-$-Defektmutationen verfügbar sind.

Die Exonsequenzen haben eine Gesamtlänge von 1 164 bp (Nobrega & Tza-

Distanz zwischen Markerpositionen	bp	Anzahl der Endpunkte	relative Häufigkeit	relative Endpunkthäufigkeit pro 100 bp
1 - 12	415	19	14%	3,4%
13 - 15	725	19	14%	1,9%
16 - 20	680	13	9%	1,3%
21 - 22	350	22	16%	4,6%
23 - 26	700+	37	26%	3,7%
27 - 28	1 500+	13	9%	0,6%
29 - 31	600+	11	8%	1,3%
32 - 34	450	13	9%	2,0%
35 - 36	600	9	6%	1,0%
36 - 37	800+	11	8%	1,0%
37 - 43	350	10	7%	2,0%
				Mittel: 2,1%

Tab. 8: Bestimmung der relativen Endpunkthäufigkeiten von mtDNS-Segmenten in rho$^-$-Subklonen der COB-Region. Die Analyse beruht auf den in Abb. 19 gegebenen Ergebnissen (+ = geschätzte Abstände)

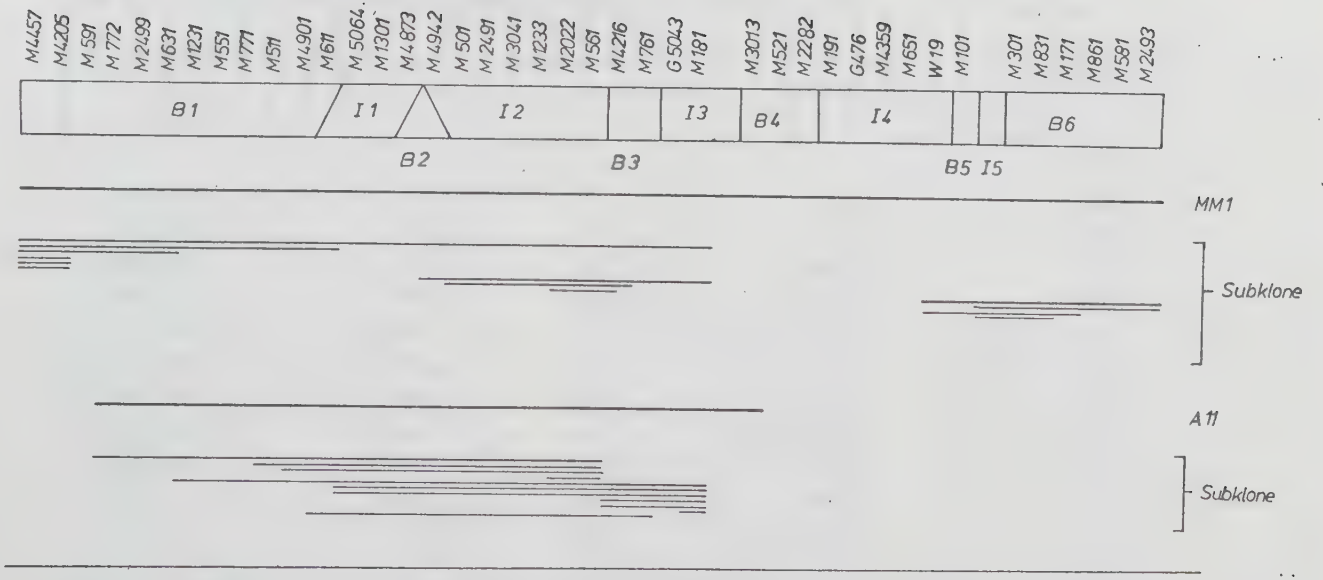


Abb. 20: Erhöhung der Anzahl von rho⁻-Endpunkten im COB-Gen mit Hilfe von Subklonierung

In der Abbildung werden rho⁻ MM1 und A11, die die COB-Region ganz oder teilweise rekonstituieren, aufgeführt. Ihre Subklonierung, die spontan zur Entstehung von neuen kürzeren rho⁻ führt, zeigt auf, dass die Anzahl der rho⁻ -Endpunkte in der COB-Region deutlich erhöht wird. Während A11-Subklone 9 neue rho⁻ -Termini hinzubringen, führt dieser experimentelle Ansatz an MM1 zu 13 neuen Endpunkten.

goloff 1980); sie sind markiert durch die cob⁻-Markergruppen 1 bis 12 (B1), 23 und 24 (B3), 28 bis 30 (B4), Gruppe 36 (B5), 38 bis 43 (B6; vgl. Abb. 19). Das Mini-Exon, das sich zwischen Gruppen 15 und 16 befindet ist durch keine cob⁻-Mutation markiert. Die Summe der rho⁻-mtDNS-Enden innerhalb dieser Exonsequenzen ist (minimal) 79 (44,6%). Sie fallen in 19 Kartenabschnitte (z.B. 3 rho⁻-Endpunkte zwischen Markergruppen 5 und 6). Nimmt man an, dass alle in einem der 19 Abschnitte endenden rho⁻-mtDNS-Moleküle in der gleichen kurzen Sequenz enden, ergibt sich daraus eine (minimale) mittlere Häufigkeit von 1,6 rho⁻-mtDNS-Endpunkten pro 100 bp. Wird umgekehrt angenommen, dass alle 79 rho⁻-mtDNS-Enden molekular verschieden sind, errechnet sich ein mittlerer Wert von 7 Endpunkten pro 100 bp.

In Tab. 8 sind die Distanzen zwischen 11 Markerpositionen angegeben, die z.Z. bekannt sind oder geschätzt werden können (+). Auf dieser Basis ist eine relative Endpunkthäufigkeit für diese 11 Teilbereiche des COB-Gens kalkuliert worden. Es errechnet sich eine durchschnittliche Häufigkeit von 1,6 rho⁻-Endpunkten pro 100 bp, eine ähnlicher Wert wurde bei Berücksichtigung der Exonsequenzen allein als Minimum errechnet (s. oben). Die Abweichungen der für Teilbereiche bestimmten Endpunkthäufigkeiten sind gering. Sie über- bzw. unterschreiten den mittleren Wert um den Faktor 2 - 3. Da bei der Suche nach neuen, kürzeren rho⁻ in COB bestimmte Gesichtspunkte - z.B. Trennung der Introns 1 und 2 - den experimentellen Satz diktierten, ist eine leichte Überrepräsentation von rho⁻ im mittleren Teilbereich (Gruppen 13 bis 23) die Folge gewesen; allein daraus mag die leicht überdurchschnittliche Endpunkthäufigkeit in diesen Teilbereichen resultieren. Bei Wertung der geringen Stichprobengrösse und des experimentellen Ansatzes bei Isolierung der Subklone ist also festzustellen, dass keine Teilsequenz bezüglich der Häufigkeit von rho⁻-Endpunkten signifikant bevorzugt ist. Deren Verteilung ist also annähernd statistisch.

Es kann nicht angenommen werden, dass dieser Teilbereich des Genoms mit differenzierenden rho⁻ bereits gesättigt ist. Mit anderen Worten, bei intensiver Suche kann sicherlich die Anzahl solcher rho⁻ vergrössert werden, was mit einem Anstieg der Endpunkte pro 100 bp einherginge. Als Beispiel können MM1 und A11 (Abb. 20) angeführt werden. MM1 erstreckt sich über das komplette COB-Gen, A11 dagegen über einen Teilbereich (Gruppen 1 bis 30). Ausgehend von beiden Endpunkten kommen bei Subklonierung 9 (A11) bzw. 13 (MM1) neue Endpunkte hinzu.

3. Untersuchungen zur Suppressivität

In den obigen Betrachtungen sind rho$^-$-Mutanten untersucht worden im Hinblick auf: (a) ihre Organisation (Kapitel 1.3.) und (b) ihren Verteilungsmodus im mitochondrialen Genom (Kapitel 2). Ein weiteres Kriterium, nämlich Suppressivität, das zur Charakterisierung von petites herangezogen werden kann, wurde bisher ausser Betracht gelassen. Von Ephrussi et al. 1949 entdeckt und erstmals 1955 genauer beschrieben, wird darunter das Auftreten atmungsdefekter Klone unter den Zygotennachkommen aus einer rho$^+$ x rho$^-$ -Kreuzung verstanden. Die Häufigkeit der letzteren ist unterschiedlich (1% bis 99%) und abhängig von beiden Eltern, wie auch von den experimentellen Bedingungen (Ephrussi et al. 1955). Kurzum, dieses Phänomen kann als'Pseudodominanz' (Carnevali et al. 1969) des rho$^-$-Genoms angesprochen werden. Setzt sich dagegen in einer solchen Kreuzung der rho$^-$-Phänotyp nicht durch, d.h. die Nachkommen sind alle atmungskompetent wie der Wildtypelter, so wird der rho$^-$-Partner als "neutral" klassifiziert (Ephrussi et al. 1955).

Zu diesem bis heute unaufgeklärtem Phänomen der Suppressivität sind eine Vielfalt von Studien gemacht worden (Ephrussi et al. 1955 & 1965, Slonimski et al. 1968, Rank et al. 1970a & b, Carnevali et al. 1969, Perlman et al. 1974; Bernardi 1979, Review; Bernardi et al. 1980 Blanc et al. 1980 & 1982, Dujon et al. 1980b; Bernardi 1982, Review), die auf zwei Grundvorstellungen hinauslaufen:

1) Suppressivität basiert auf der bevorzugten Replikation des rho$^-$-Partners, der in die Kreuzung eingebracht wird (redundante Origin-Sequenzen könnten die Ursache hierfür sein),
2) fehlerhafte Rekombination zwischen rho$^+$- und rho$^-$-Genomen führt zur Fragmentation und Abbau der rho$^+$-Moleküle.

3.1. Charakterisierung von Mutanten bezüglich ihrer Suppressivität

Für die Untersuchungen sind rho$^-$-Mutanten aus der Induktion von KL 14-4A (Exp. I, Tab. 1) herangezogen worden. Bei ihrer Auswahl ist darauf geachtet worden, jeden Genombereich zu erfassen.

In Tab. 9 sind die Daten aus den Suppressivitätsuntersuchungen zusammengestellt; rho$^-$-Klone vom gleichen Genotyp sind in einer Klasse zusammengefasst (Klassen I - XXV). Es wird deutlich, dass (1) kei-

Klasse	rho⁻ (Nummer)	Gesamtzahl petites	% Suppressivität	mitochondrialer Genotyp											
				CAP	M4706	OL11	M4690	M4752	M1354	M1231	M7181	PAR	OX12	OX11	T378	CAP
I	109	573	69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
II	222	371	61	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
	56	392	5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
III	218	306	53	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
	113	425	37	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
IV	261	226	50	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	142	354	43	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	71	643	31	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	117	389	1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
V	125	377	48	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
VI	241	419	43	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
VII	137	476	41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
VIII	37	198	40	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	213	248	38	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	108	678	20	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	67	474	12	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
IX	31	357	33	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	110	331	15	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	38	215	11	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
X	112	396	25	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
XI	103	371	23	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
XII	52	420	23	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	5	909	16	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
XIII	33	453	22	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
		311	5													
XIV	50	742	2	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	258	468	1	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
XV	210	386	22	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
XVI	10	751	14	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	236	0,4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XVII	101	816	10	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
XVIII	212	285	10	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	35	364	4	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
XIX	260	209	9	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
XX	135	434	7	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	62	837	2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
XXI	11	870	6	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	45	239	6	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
XXII	58	863	3	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	61	991	2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
XXIII	245	324	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
XXIV	128	305	2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
XXV	122	409	2	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		848	1													

ne hochsuppressiven rho$^-$ in dieser Kollektion vorhanden sind und (2) die Suppressivität der getesteten Klone ein breites Spektrum von 1% bis 69% umfasst. Es lässt sich aber keine Korrelation zwischen rho$^-$-Komplexität oder rho$^-$-Lage und Suppressivität feststellen. Petites, die laut genetischem Test nur noch einen mitochondrialen Marker tragen (z.B. rho$^-$ 10 mit 14% Suppressivität), zeigen die gleiche Suppressivität wie eine wesentlich komplexere Mutante (z.B. rho$^-$ 110 mit 15% Suppressivität), die noch ca. 80% des Genoms enthält. Dass an Hand der vorliegenden Daten zwischen rho$^-$-Lage und Suppressivität kein direkter Zusammenhang besteht, sei am folgenden Beispiel einiger Mutanten erläutert: petites 109 und 222 zeigen gleiche Suppressivität, enthalten jedoch keine gemeinsamen Genomabschnitte. Andererseits können petites teilweise überlappen - Klassen XII und XXI - aber deutlich unterschiedliche Suppressivität zeigen.
Werden Mutanten aus einer Klasse untereinander verglichen, so zeigen sie neben dem erwartungsgemäss gleichen (Klassen XII, XXII) auch signifikant unterschiedliches Suppressivitätsverhalten (Klassen II, XVII). Bemerkenswert ist die starke Schwankungsbreite, die bei diesem Test oft zu beobachten ist. In einigen Fällen variiert das suppressive Verhalten ein und derselben Mutante (vgl. hierzu rho$^-$ 33,aus Klasse XIII), was darauf zurückzuführen sein mag, dass sich die zwei verwendeten Kulturen dieser rho$^-$ auf Grund sekundärer Deletionsereignisse bereits unterschieden haben.
An Hand der durchgeführten Untersuchungen kann eine Entscheidung zwischen beiden eingangs erwähnten Modellen zur Suppressivität nicht getroffen werden. Um dennoch einer Lösung dieses Phänomens näherzukommen, ist die Aufmerksamkeit auf jene Klasse von petites gerichtet worden, die hohe Suppressivität zeigen.

Tab. 9: Tabellarische Übersicht zu den Suppressivitätsuntersuchungen

42 rho$^-$ sind aufgeführt, wobei jede durch eine Nummer gekennzeichnet ist (z.B. 109 oder 37 usw.). Zusätzlich sind die Mutanten in Klassen (I-XXV) zusammengefasst. Diese Einteilung erfolgt nach der in den einzelnen Mutanten enthaltenen mitochondrialen Information, die der schematischen Darstellung des mitochondrialen Genoms entnommen werden kann: Retention bzw. Deletion sind durch (+) bzw (-) symbolisiert. Neben Suppressivität (%) ist auch die Gesamtzahl untersuchter Zygotenklone angegeben.

petite	% Suppressivität	CAP	M4696	OLI1	M4490	M4752	COB	OXI3	PAR	OXI2	OXI1	TSM8	CAP
HS 1-1	99%	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
HS 1-2	98%	–	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
HS 1-3	99%	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
HS 1-5	98%	–	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
HS 1-6	99%	–	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
HS 1-7	98%	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
HS 1-8	100%	–	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
HS 1-9	99%	–	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
HS 1-10	97%	–	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
HS 2-1	84%	–	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
HS 2-3	71%	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
HS 2-4	94%	–	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–

Tab. 10: Genetische Lokalisierung von hochsuppressiven Mutanten

3.2. Genetische Lokalisierung hochsuppressiver rho$^-$-Mutanten

Die unter Material und Methoden beschriebene Isolierungsmethode führte zur Selektion von 12 petites im Stamm KL 14-4A, deren Suppressivität über 80% liegt (Tab. 10). Durch Kreuzung mit einer das ganze mitochondriale Genom erfassenden Sammlung von mit$^-$- und ANT^S-Testern konnten bei 8 suppressiven rho$^-$ die Retention des OLI1-Genes, repräsentiert durch die Marker OLI1^R, M4490, M4752, nachgewiesen werden, während bei den übrigen 4 Mutanten gleiches Vorgehen nicht zum Ziele führte, da keiner der geprüften Marker zurückbehalten war.
Nach Bernardi (1979 & 1982, Reviews) und Dujon (1981, 1982) zeichnen sich suppressive rho$^-$ durch die Retention von weitgehend homologen DNS-Sequenzen, ori oder rep, aus. Hochsuppressive mtDNS (hs-mtDNS) mit solchen Sequenzen wurde in 17 Fällen (Bernardi 1982, Review) gefunden. Hybridisierungsstudien zeigten, dass solche homologen Sequenzen, wie in hochsuppressiven rho$^-$ gefunden, zusätzlich in mindestens 6 Genomsegmenten, also insgesamt mindestens 7mal vorkommen, eine davon nahe OLI1. Vermutlich tragen die hier gefundenen hs-Mutanten diese ori/rep-Sequenz. Um die Retention dieser ori/rep-Sequenz an den 8 genetisch lokalisierten wie an anderen 4 hs zu prüfen, wurden im folgenden Hybridisierungsexperimente durchgeführt.

3.3. Physische Kartierung hochsuppressiver Mutanten auf dem mitochondrialen Genom

Zur physischen Kartierung der rho$^-$-mtDNS einiger hs-rho$^-$ wurde folgendermassen vorgegangen: mtDNS des Ausgangstammes KL 14-4A, aus dem die hochsuppressiven Mutanten isoliert wurden, ist mit dem Restriktionsenzym HhaI gespalten worden, was zu 11 Fragmenten führt (Sanders et al. 1977a). Nach Auftrennung der Spaltprodukte in einem 0,7%-igen Agarosegel sind die Fragmente nach Southern (1975) auf Nitrocellulosefilter geblottet worden. Für die Lagebestimmung der hochsuppressiven Mutanten sind diese mit Hilfe der "nick translation" (Rigby et al. 1977) radioaktiv markiert worden und anschliessend mit HhaI-gespaltener, auf Nitrocellulose fixierter DNS hybridisiert worden (Abb. 21).
Die physische Lokalisierung der Mutanten HS 1-1, HS 1-3, HS 2-3 auf dem mitochondrialen Genom kann Abb. 22 entnommen werden. Die Mutanten lassen sich zwei verschiedenen genomischen Fragmenten zuordnen. HS 1-1 und HS 1-3 geben mit HhaI-Fragment 5, HS 2-3 mit HhaI-Fragment 7 posi-

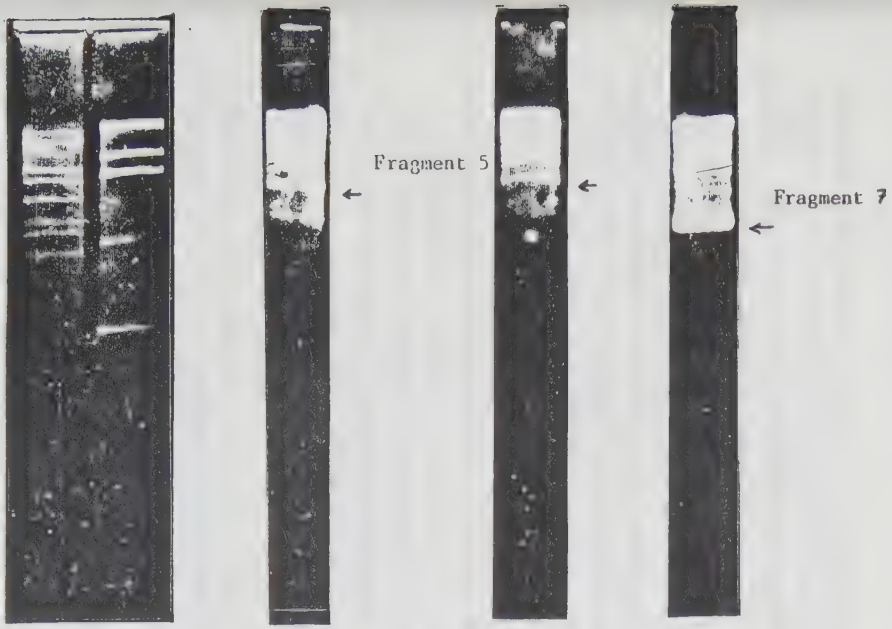


Abb. 21: Physische Lokalisierung einiger hochsuppressiven Mutanten auf dem mitochondrialen Genom

HhaI-geschnittene WT-DNS aus KL 14-4A wird in einem 0,7%-igen Agarosegel aufgetrennt (I). Zur Grössenbestimmung der Fragmente wird EcoRI-verdaute DNS vom Phagen P22 mitelektrophoretisiert (II). Das Gel wird mit EB gefärbt, unter UV-Licht fotografiert und nach Southern et al. (1975) auf Nitrocellulosefilter geblottet. Mutanten HS 1-1, HS 1-3 und HS 2-3 werden mit ^{32}P radioaktiv markiert, um sie zur Hybridisierung gegen KL 14-4A Gesamt-mtDNS einzusetzen. Spuren III-V zeigen die Radioautographie der mit den einzelnen Mutanten hybridisierten Filter. Der Pfeil deutet auf das erhaltene Hybridisierungssignal.

tive Hybridisierungssignale.
Neben den Fragmenten 5 bzw.7 ist starke Hintergrundschwärzung der Autoradiographie zu sehen. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, dass die rho^+-DNS-Fragmente 7mal weitgehend homologe ori-Sequenzen tragen und daher mit den ^{32}P-markierten ori-Sequenzen der hs-rho^-mtDNS hybridisieren. Es sind also alle 3 im Segment CAP-OLI1-COB-OLI2 liegenden ori-Sequenzen in hs-rho^- dieser Kollektion nachgewiesen und damit erstmals eine hs mit ori6 (de Zamaroczy et al. 1981).

3.4. Identifizierung der Restriktionsfragmente mit putativen "origin"-Sequenzen

Bernardi und Mitarbeiter haben an 17 spontanen hochsuppressiven Mutanten gezeigt, dass sie eine gemeinsame Sequenz zurückbehalten, die mehrmals in der mtDNS vorkommt (Bernardi 1982, Review; Baldacci et al. 1982, Marotta et al. 1982). Eine dieser hochsuppressiven Mutanten (mit "b" bezeichnet; Gaillard et al. 1979), wurde für die folgenden Untersuchungen herangezogen, um in den hier untersuchten Mutanten (Tab. 10) das Vorhandensein von gemeinsamen, Suppressivität bedingenden Sequenzen mit Mutante "b" zu prüfen. Hierzu wurde von den bereits untersuchten, hochsuppressiven Stämmen (Tab. 10) einige ausgewählt, mit HpaII geschnitten, die Restriktionsfragmente auf Nitrocellulosestreifen übertragen und mit ^{32}P-markierter rho^-DNS (Mutante "b") hybridisiert. Wie aus Abb. 23 zu entnehmen ist, gaben alle ausgewählten hochsuppressiven Mutanten ein positives Hybridisierungssignal. Dies bestätigt die Ergebnisse von Bernardi und Mitarbeitern, dass hs-rho^--mtDNS Sequenzhomologien aufweisen. In Übereinstimmung mit früheren Analysen ist auch hier festzustellen, dass die hs-rho^-mtDNS von geringer Komplexität ist, nämlich, HS 1-1 (800 bp), HS 1-3 (650 bp), HS 2-3 (650 bp).
Gleiches gilt für andere, hier nicht gezeigte hs-rho^-mtDNS. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die im Rahmen dieser Arbeit isolierten hochsuppressiven rho^- drei verschiedene Genomabschnitte tragen - HhaI-Fragmente 5 und 7 (vgl. Abb. 22) und den OLI1-Bereich - die ihnen ihr suppressives Verhalten verleihen. Sie zeigen Homologie mit einer bekannten ori-Sequenz der hochsuppressiven rho^- "b" (Gaillard et al. 1979).

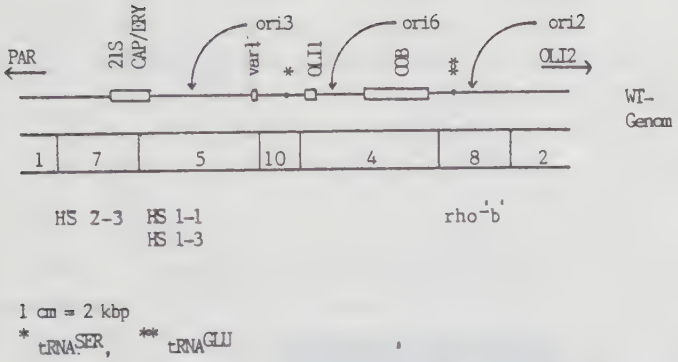


Abb. 22: Zuordnung von 3 hs-Mutanten ihren physischen Positionen auf dem mitochondrialen Genom

Die Darstellung zeigt den Genombereich COB einschliesslich CAP zusammen mit dem dazugehörenden Ausschnitt der HhaI-Karte nach Grivell et al. 1977 und die in diesem Bereich nachgewiesenen ori-Sequenzen (Bernardi 1982, Review). Zusätzlich ist die Position von Mutante 'b' (Gaillard et al. 1979), Träger einer ori2-Sequenz eingetragen.

1a 1b 2a 2b 3a 3b
HS 1-1 HS 1-3 HS 2-3

Abb. 23: HpaII-Verdau von hochsuppressiven Mutanten und Hybridisierung mit ^{32}P-markierter mtDNS aus Mutante 'b'.

1a-3a: Auftrennung von HpaII-geschnittener mtDNS aus HS 1-1, HS 1-3 und HS 2-3; 1%-iges Agarosegel, mit EB gefärbt.

1b-3b: Radioautographien
Mutante 'b' wurde nach radioaktiver Markierung mit ^{32}P als Hybridisierungsprobe zum Nachweis von homologen ori-Sequenzen eingesetzt.

4. Charakterisierung einer mit$^-$-Mutante aus dem $tRNS^{ser}_{UCN}$-Gen (M4696)

Die rho$^-$-Deletionskartierung und die Rekombinationsanalyse (Asenbeck: Diplomarbeit) führten zur Lokalisierung einer Mutation M4696, die hitze-sensiblen Phänotyp bedingt,im Bereich zwischen CAP/ERY und OLI1. In der vorliegenden Arbeit wird die Lage dieser Mutation bestätigt und ihre Position als näher an OLI1 als an CAP/ERY bestimmt. Das Fehlen der mitochondrialen Proteinsynthese (R.J.Schweyen: persönliche Mitteilung) und der konditionelle Phänotyp deuteten bereits auf eine syn$^-$-Mutation hin. Wie in der Einleitung angeführt , handelt es sich bei letzteren um Defekte, die die mitochondriale Transkriptions- und Translationsfunktion betreffen, also um Mutationen in tRNS- bzw. ribosomalen Genen. Ihrer Kartenposition entsprechend könnte M4696 eine Mutation des var1-Genes oder des Genes der $tRNS^{ser}$ sein. Damit übereinstimmend ist der Befund, dass der rho$^-$-Klon AS11, der M4696 als einzige mitochondriale Mutante rekonstituiert ein mtDNS-Segment (in tandem Re-iteration) enthält, das diese Gene trägt (Abb.24).

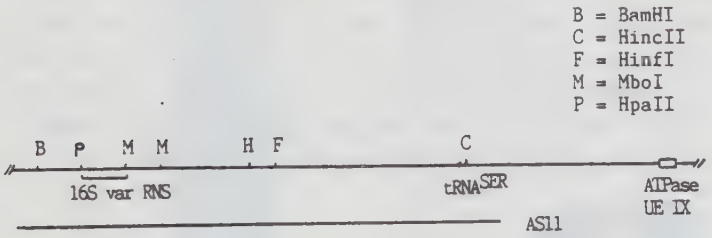
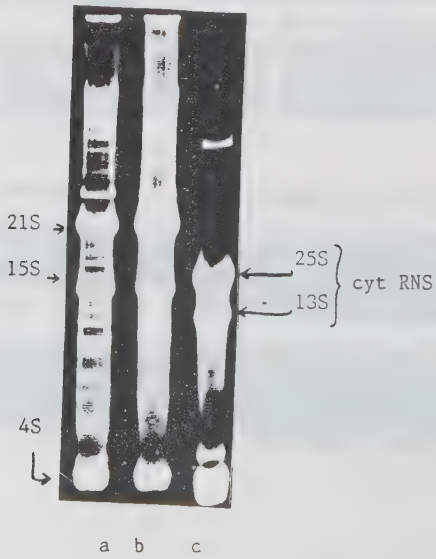


Abb..24: Position der rho$^-$ AS11 auf der physischen Karte des mitochondrialen Genoms

4.1. Präparation und gelelektrophoretische Auftrennung mitochondrialer Transkripte

Mitochondriale RNS aus dem Wildtyp, 777-3A, und der Mutante, M4696 (bei permissiver und nicht-permissiver Temperatur), wurde nach Locker et al. (1979) präpariert und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Eine genaue Moekulargewichtsbestimmung von einzelsträngigen RNS-Molekülen wird durch ihre Sekundärstruktur erschwert, welche aber durch denaturierende Agentien - z.B. Harnstoff, Formamid, Glyoxal, Methylquecksilberhydroxid - weitgehend aufgehoben werden kann. Für die nachfolgenden Untersuchungen ist Methylquecksilberhydroxid als geeignetes Denaturierungsmittel gewählt worden (vgl. Material und Methoden). Wegen des extrem niedrigen GC-Gehalts mitochondrialer RNS (unter 23%) gegenüber anderen RNS-Spezies ist die Kalibrierung der Transkripte erschwert. Es fanden deswegen die mitochondrialen 21S- und 15S-rRNS-Moleküle (3 200 b und 1 600 b ; Tabak et al. 1979) zur Grössenbestimmung Verwendung (Abb. 25).
Die Bandenmuster von WT und Mutante (permissive Temperatur) sind sehr ähnlich, während die Muster der Mutanten-RNS bei nicht-erlaubter Temperatur abweicht; die stärksten BAnden sind nicht die mitochondrialen rRNS-Moleküle, sondern ihre cytoplasmatischen Gegenstükke, was auf stärkere Kontamination der Präparation durch cytoplasmatische RNS-Moleküle hinweist.
Die Analyse der mitochondrialen RNS durch Gelelektrophorese allein ermöglicht keine Entdeckung spezifischer Transkripte. Um dies dennoch zu erreichen, werden nach Alwine et al. (1977) durch Blotten die im Gel aufgetrennte RNS auf DBM-Papier übertragen (Northern Blotting). Diese Technik bedingt die kovalente Bindung der Nukleinsäuren an die Diazobenzyloximethyl-Gruppen des aktivierten Papiers. Der



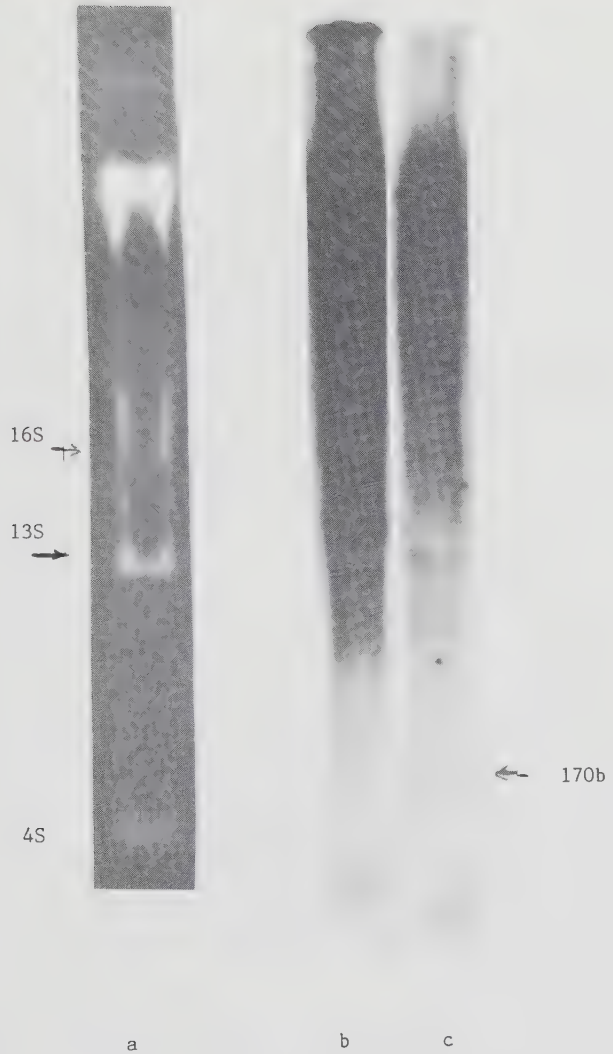


Abb. 26 : Hybridisierung ^{32}P-markierter rho$^-$ AS11 gegen Wildtyp-RNS (Spur a) und Mutanten-RNS präpariert unter permissiven (Spur b) und nicht-permissiven Bedingungen (Spur c).

Nachweis spezifischer Transkripte erfolgt nun durch radioaktiv markierte Hybridisierungsproben.
Diese rho$^-$ erschien geeignet, da sie im genetischen Test von allen zur Verfügung stehenden mitochondrialen Testern nur M4696 zum WT-Phänotyp verhilft und eine Länge von nur 2 kb hat. Ihre Restriktionsanalyse (Abb.26) konnte sie als tandem reiterierte rho$^-$ identifizieren mit einer Länge von ca. 2 kbp.
Abb.26(Spur a) zeigt das Ergebnis dieses ersten Ansatzes zur Charakterisierung von M4696. Die Radioautographie des Blots zeigt 3 Banden, die 16S, 13S und 4S entsprechen. Daraus folgt, dass bei Verwenden von rho$^-$ AS11 als Hybridisierungsprobe neben zwei höheren Transkripten auch ein 4S Transkript nachgewiesen werden kann. Die 16S- und 13S-Transkripte können bei Hinzuziehen der physischen Lokalisierung von AS11 (Abb.24) erklärt werden: es sind Transkripte der var1-Region, die in der mtDNS-Sequenz von AS11 vermutlich vollständig enthalten ist. Laut Butow et al. (1982) zeigen rho$^+$- und rho$^-$-var1$^+$-Stämme 4 Transkripte (19S, 16S, 14S, 13S). Drei dieser Transkripte (16S, 14S, 13S) hybridisieren nur mit einem MboI/HaeIII-Fragment von 0,25 kbp aus der var1-Region und mit keiner anderen mtDNS-Sequenz.
Die 4S RNS ist mit grosser Wahscheinlichkeit die tRNS^{ser}, die einzige 4S kodierende, in rho$^-$ AS11 zurückbehaltene Sequenz.
Spuren b und c in Abb. 26 zeigen die mitochondriale RNS aus der Mutante, unter permissiven (23^{o}C) und nicht-permissiven (36^{o}C) Bedingungen gezüchtet, nach Blotting und Hybridisierung mit ^{32}P-markierter AS11-DNS. Übereinstimmend damit ist der Befund, dass die Mutante auch bei 23^{o}C suboptimales Wachstum zeigt (Asenbeck: Diplomarbeit).
Nach Wachstum der Zellen unter permissiven Bedingungen ist ein deutliches Signal mit der tRNS-Fraktion erkennbar, während bei 36^{o}C die 4S-Fraktion schwächer zu erkennen ist. Hier ist jedoch ein zusätzliches Transkript von 170b Länge sichtbar. Es könnte sich hierbei um eine Vorstufe der tRNS^{ser} handeln; demzufolge würde Mutation M4696 die Reifung der tRNS^{ser} beeinträchtigen. Anhaltspunkte hierfür wären nur durch spezifischere Hybridisierungsproben und/oder durch spezifische Anreicherung der tRNS-Fraktion zu erhalten. Eine weitere Möglichkeit wäre, die mitochondriale RNS aus rho$^-$AS11 zu charakterisieren.

5. Bestimmung genetischer Distanzen von Markern

5.1. Gene auf dem rho^+-Genom

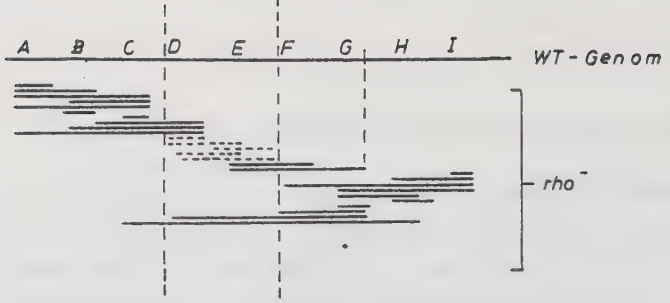
Genetisches Kartieren mitochondrialer Marker wurde zunächst mit Hilfe von Rekombinationsanalysen (rho^+mut_x x rho^+mut_y) durchgeführt (Avner et al. 1973, Wolf et al. 1973, Schweyen et al. 1976c). Es erwies sich jedoch als unmöglich, eine Reihung der damals verfügbaren 4 oder 5 Marker abzuleiten, da in den meisten Fällen die Häufigkeiten der Rekombinanten dem in diesem Kartierungssystem maximalen Wert von 20-25% nahe kamen, die Marker also ungekoppelt erschienen.

Als alternative Kartierungsmethode wurde daher die rho^--Populationsanalyse entwickelt. Diesem Ansatz liegt die Vorstellung zu Grunde, dass bei rho^--Entstehung zwei eng benachbarte Marker mit einer grösseren Wahrscheinlichkeit gemeinsam deletiert bzw. zurückbehalten werden als zwei voneinander entfernt liegende (Molloy et al. 1975, Schweyen et. al. 1976b).

Ähnliches gilt für die Trennung zweier Marker: Retention des einen und Verlust des anderen ($rho^+X^+Y^+ \longrightarrow rho^-X^+Y^o$ und $rho^-X^oY^+$) sollte bei geringem Abstand zweier Marker selten, bei grossem Abstand aber häufig sein. Da diese Betrachtungsweise derjenigen der allgemeinen Rekombinationsanalyse (X^+Y^+ x $X^-Y^- \longrightarrow X^+Y^-$, X^-Y^+) analog ist, soll sie im folgenden Verwendung finden.

Diese Betrachtungsweise fand bereits Eingang in die Bestimmung der rho^--Endpunkthäufigkeiten (Kapitel 2.2.), aus der eine positive Korrelation zwischen Markerdistanz und Anzahl von rho^--Endpunkten gefolgert wurde. Es konnte auch eine annähernd statistische Verteilung von rho^--Endpunkten über das gesamte mitochondriale Genom gezeigt werden.

Um nun - analog zur Rekombinationskartierung - Trennungshäufigkeiten zweier Marker und verschiedener rho^--Populationen vergleichen zu können, wäre die gleiche Retentionswahrscheinlichkeit aller mitochondrialen Marker Voraussetzung. Dies ist jedoch nicht gegeben - wie in Kapitel 2.1. bereits diskutiert - die Retention von Markern verschiedener Regionen unterschiedlich ist; sie ist besonders gering für OXI3-Marker. Verschiedene Ursachen können zur Erklärung herangezogen werden (vgl. Diskussion). Die durch unterschiedliche Retention bedingte Verzerrung in der Bestimmung von Markerdistanzen soll am folgenden Schema erläutert werden:



A.B.C.D.E.F.G.H.I. symbolisiert das mitochondriale Genom (rho^+). D-E soll ein Genomsegment darstellen, dessen alleinige Retention für das Überleben einer rho^- nachteilig sei, während rho^- mit den angrenzenden Bereichen A-B-C und F-G-H-I eine normale Überlebenschance haben sollen. Zum Teitpunkt unmittelbar nach dem mutativen Ereignis der rho^--Bildung seien alle hier aufgeführten rho^- in der Zelle vorhanden.

Auf Grund ihrer herabgesetzten Überlebenschance sollen alle im Schema gestrichelt eingezeichneten rho^--Genome bis zur Sekundärklonbildung verloren gehen, während alle, die über D-E hinaus noch Bereiche A-B-C und/oder F-G-H-I teilweise oder ganz enthalten, überleben sollen. Die Anzahl der zwischen C/D und E/F trennenden rho^- wird hierdurch geringer; dies resultiert - bei Gründung der Distanzberechnung auf rho -Trennungshäufigkeiten - in einer Herabsetzung der Distanzen C-D, D-E und E-F.

Es wird also ersichtlich, dass eine Korrektur eingeführt werden muss, um Trennungshäufigkeiten direkt zu vergleichen und hieraus eine quantitative Kartierung mitochondrialer Marker abzuleiten.

Schweyen et al. haben 1976/1978 eine solche Korrektur, den Abstandskoeffizienten Q, eingeführt. Die experimentell gefundene Häufigkeit der Genotypen X^+Y^o und X^oY^+ (die Trennung von X und Y anzeigend) werden in Relation gesetzt zur Häufigkeit dieser Genotypen, wie sie sich bei Annahme fehlender Kopplung von X und Y als statistischer Wert unter Verwendung der Einzelmarker-Retention errechnet

$$(X^+Y^o)_{\text{statistisch}} = (X^+)\ \ (Y^o)$$

$$(X^oY^+)_{\text{statistisch}} = (X^o)\ \ (Y^+)$$

$$Q = \frac{(X^+Y^o)_{\text{experimentell}} + (X^oY^+)_{\text{experimentell}}}{(X^+Y^o)_{\text{statistisch}} + (X^oY^+)_{\text{statistisch}}}$$

(X^+) = Einzel-Marker-Retentionshäufikeit

(Y^o) = Einzel-Marker-Deletionshäufigkeit

(X^+Y^o) bzw. (X^oY^+) = Häufigkeit dieses Genotyps

Bei hoher Trennungshäufigkeit werden Q-Werte nahe 1 erreicht; X und Y werden quasi statistisch verteilt, sie erscheinen ungekoppelt. Q-Werte $\ll 1$ weisen auf enge Kopplung hin.

Im folgenden ist die quantitative Kartierung mitochondrialer Loci beschrieben, die durchgeführt wurde

1) an Hand einer umfangreichen Sammlung von im Vergleich zu Schweyen et al. (1976b, 1978) neu hinzugekommenen mit rho^--Mutanten,
2) mit rho^--Populationen verschiedenen Ursprungs, d.h. aus unterschiedlichen Stämmen und mehreren Induktionen.

Die für die einzelnen Induktionen errechneten Q-Werte sind in Tab.11-14 zusammengefasst. Die Marker sind auf dem linearisierten Genom, beginnend mit CAP, in der Reihenfolge ihrer Positionen aufgetragen. Entsprechend nehmen die Q-Werte von einem Wert $\ll 1$ ausgehend zu bis ca. 1,0 und nehmen entsprechend wieder ab bei Markerpaaren der anderen Hälfte des circulären Genoms. Dies sei am Beispiel von Tab.12 erläutert (s. obere horizontale Reihe):

CAP-M4696 = 0,49
CAP-OLI1 = 0.67
CAP-OXI3 = 1,0
CAP-OXI2 = 0,87
CAP-M5391 = 0,43

Die Q-Werte benachbarter Marker (s. mittlere Diagonale, Tab.12) erreichen den maximalen Wert 0.61; d.h. diese Marker zeigen deutliche Kopplung, eine Voraussetzung jeglicher Kartierung. Zwischen Markern der gleichen Gen-Region (COB) wird wie zu erwarten engste Kopplung beobachtet (Q-Werte 0 bis 0,49). Ähnliches gilt für die an anderen rho^--Populationen erhobenen Befunde (Tab. 11,13, 14).

Die Additivität der Marker-Distanzen (Abb. 4; rho^--Population aus Exp. III) zeigt weiterhin, dass diese Analyse für Kartierungszwecke geeignet ist: eine Gesamtdistanz - z.B. OXI1-CAP = 0,54 (Q-Wert) ist immer grösser als die beiden Teildistanzen OXI1-TSM = 0,24 und TSM-CAP = 0,41. Hieraus ergibt sich - ähnlich einer Zwei-Faktor-Analyse - die Aufeinanderfolge der Marker OXI1-TSM-CAP.

Da Q-Werte verschiedener rho^--Populationen sich in dieser Weise nicht direkt vergleichen lassen, werden die Abstandskoeffizienten einer jeden Induktion normiert (Tab. 15): es werden aus jeder rho^--Population die Q-Werte von ausgewählten Markern aufsummiert. Dabei wird nur je ein Marker einer Region (eines Genes) berücksichtigt. Nun wird die

Segment	KL 14-4A, Exp. I			KL 14-4A, Exp. II			RM 511-4A, Exp. III			RM 590-9D, Exp. IV			Mittelwert		physische Distanz
	$Q_{rel.}$	Q%	kbp	$Q_{rel.}$	Q%	kbp	$Q_{rel.}$	Q%	kbp	$Q_{rel.}$	Q%	kbp	%	kbp	kbp
CAP/ERY - OLI1	0,58	11,6	8,7	0,67	14,4	10,8	1,0	15,1	11,3	0,44	14,7	11,0	14,0	10,5	11,3
OLI1 - COB_m	0,46	9,2	6,9	0,35	7,5	5,6	0,50	7,5	5,6	0,27	9,0	6,7	8,3	6,2	5,8
COB_m - $OXI3_m$	0,88	17,6	13,2	0,74	16,0	12,0	1,15	17,3	13,0	0,58	19,3	14,0	17,6	13,2	17,0
$OXI3_m$ - PAR	0,58	11,6	8,7	0,84	18,1	13,6	1,21	18,3	13,7	0,51	17,0	13,0	16,3	12,2	12,0
PAR - OXI2	0,73	14,6	10,9	0,61	13,1	9,8	1,22	18,4	13,8	0,48	16,0	12,0	15,5	11,6	12,5
OXI2 - OXI1	0,71	14,2	10,6	0,25	5,4	4,0	0,47	7,1	5,3	0,22	7,3	5,5	8,5	6,4	4,5
OXI1 - TSM	0,37	7,4	5,5	0,49	10,6	7,9	0,40	6,0	4,5	0,18	6,0	4,6	7,5	5,6	4,2
TSM - CAP/ERY	0,69	13,8	10,3	0,78	14,7	11,0	0,68	10,3	7,7	0,32	10,7	8,0	12,4	9,3	7,7
	5,0*			4,63*			6,63*			3,0*					

Summe gleich 100% gesetzt, d.h. das mitochondriale Genom wird in 100 Einheiten eingeteilt und die Länge der einzelnen Abschnitte - die Begrenzung stellt das jeweils betrachtete Markerpaar dar - bestimmt (Tab. 15). Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass die an Hand der 4 verschiedenen rho$^-$-Populationen ermittelten Genabstände gute Übereinstimmung zeigen.

Einen Vergleich zwischen physischen Längen im mitochondrialen Genom (die Werte basieren auf der von Grivell 1983 zusammengestellten physischen Karte des Genoms; vgl. Abb. 4) und genetisch ermittelten Marker-Distanzen bringt Tab. 16. Den genetischen Angaben liegen die aus Exp. I-IV (Tab.1) ermittelten Daten zu Grunde, deren Q-Werte (Tab. 11-14) in kbp umgerechnet wurden. Überraschend ist die gute Übereinstimmung dieser Werte. Diskrepanzen sind am deutlichsten für den Bereich COB_m-$OXI3_m$. Dies mag darauf zurückzuführen sein, dass dieses Segment mehr codierende Sequenzen enthält als andere Segmente, nämlich ca. 4 kbp aus COB und ca. 7,5 kbp aus OXI3 und ca. 1 kbp aus OLI2.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Trennungshäufigkeit zweier Marker durch rho$^-$-Bildung aus verschiedenen Experimenten vergleichbar ist und - nach entsprechender Korrektur - ein gutes Mass für den Abstand dieser Marker auf dem mitochondrialen Genom abgibt. Dies unterstreicht die weiter oben angeführten Aussagen

Tab. 15: Marker-Distanzen in Experimenten I - IV

Die Tabelle zeigt eine ausführliche Aufstellung von Marker-Distanzen. Bei ihrer Kalkulation ist jedes der in diesen Experimenten getesteten Gene berücksichtigt worden. Bei den Strukturgenen - COB, OXI3, OXI2, OXI1 - wurden oft mehrere genetische Marker untersucht (vgl. auch Tab. 3). Zur Berechnung der hier aufgeführten Marker-Distanzen sind folgende in Exp. I-IV eingesetzten Strukturgen-Mutanten ausgewählt worden:

	Exp.I	Exp.II	Exp.III	Exp.IV
COB	M1231	M2011	M1231	M2011
OXI3	M7181	M7471	M7351	M7471
OXI2	M2532	M2532	M2532	M2532
OXI1	M1273	M4360	M1273	M4360

Für jeden Bereich (erste Spalte) sind Q-Werte errechnet worden, die gemäss Tab. 16 in Q% umgerechnet wurden.
Die Summe aller Q-Werte für jedes Experiment wird mit * gekennzeichnet. Distanzen, deren Bestimmung in einzelnen Experimenten nicht erfolgte, sind mit - angedeutet.

Bereich	KL 14-4A, Exp. I		KL 14-4A, Exp. II		RM 511-4A, Exp. III		RM 590-9D, Exp. IV	
	$Q_{rel.}$	$Q_{num.} = \frac{Q_{rel.}}{6,0} \times 100\%$	$Q_{rel.}$	$Q_{num.} = \frac{Q_{rel.}}{6,26} \times 100\%$	$Q_{rel.}$	$Q_{num.} = \frac{Q_{rel.}}{8,89} \times 100\%$	$Q_{rel.}$	$Q_{num.} = \frac{Q_{rel.}}{4,44} \times 100\%$
CAP - ERY	-	-	-	-	-	-	0,08	1,8%
CAP/ERY - M4696	0,65	10,7%	0,49	7,8%	1,2	13,6	0,47	10,6%
M4696 - OLI1	0,30	5,0%	0,29	4,6%	-	-	0,31	7,0%
M4696 - M4490	0,34	5,7%	0,26	4,2%	0,33	3,7%	0,31	7,0%
OLI1 - M4490	0,07	1,2%	0,15	2,4%	-	-	0,04	0,9%
M4490 - M4752	0,16	2,7%	0,22	3,5%	0,32	3,6%	0,04	0,9%
M4752 - COB	0,52	8,7%	0,38	6,1%	0,51	5,8%	0,26	5,9%
COB - OLI2	-	-	-	-	1,01	11,4%	-	-
OLI2 - OXI3	-	-	-	-	0,39	4,4%	-	-
COB - OXI3	0,88	14,6%	0,74	11,8%	1,15	13,0%	0,49	11,0%
OXI3 - PAR	0,58	9,7%	0,84	13,4%	1,21	13,7%	0,55	12,4%
PAR - OXI2	0,73	12,2%	0,61	9,7%	1,22	13,8%	0,48	10,8%
OXI2 - OXI1	0,71	11,8%	0,25	4,0%	0,47	5,3%	0,22	5,0%
OXI1 - TSM8	0,37	6,2%	0,49	7,8%	0,40	4,5%	0,18	4,1%
TSM8 - M5391	-	-	0,43	6,9%	-	-	0,12	2,7%
M5391 - M6681	-	-	-	-	-	-	0,05	1,1%
M5391 - CAP	-	-	0,43	6,9%	-	-	0,27	6,0%
TSM8 - CAP (ERY)	0,69	11,5%	0,68	10,9%	0,68	7,7%	0,32	7,2%
M6681 - CAP	-	-	-	-	-	-	0,25	5,6%
	6,0*		6,26*		8,89*		4,44*	

zur rho^-Bildung : es können beliebige Segmente aus dem rho^+-Molekül excisiert werden und als 'repeat unit' einer rho^- überleben (Abb. 6-14). Weiterhin zeigt die Betrachtung der Endpunkthäufigkeiten (Kapitel 2.2.), dass rho^--Termini eine weitgehend statistische Verteilung über das mitochondriale Genom aufweisen.

6. Feinstrukturkartierung des COB-Genes

Ein erster Versuch der Kartierung von 37 cob^--Mutationen nach dem Prinzip der Deletionskartierung wurde von Schweyen et al. 1977 gemacht, wobei eine kleine Serie von rho^--Klonen Verwendung fand, die jeweils einen Teil des Satzes von cob^--Mutanten rekonstituieren konnte. Eine Kartierung ist dabei nach folgendem Schema - ähnlich der Reihung verschiedener Gene auf dem Gesamtgenom - möglich:

	OLI1	cob_a	cob_b	cob_c	cob_d	cob_e
rho^-_1	+	+	-	-	-	-
rho^-_2	+	+	+	+	-	-
rho^-_3	-	+	+	+	+	+
rho^-_4	-	-	-	-	-	+
rho^-_5	-	-	-	+	+	+

Tab. 16: Genetische und physische Distanzen ermittelt an 4 rho^--Populationen

Die vier rho^--Populationen, an denen die hier angegebenen genetischen Distanzen ermittelt wurden, entstammen Experimenten I-IV (vgl. Tab.1). Links in der ersten Spalte wird das jeweils untersuchte genomische Teilsegment angegeben. Hierauf folgen die relativen Q-Werte (Tab. 11-14 entnommen). Um die numerischen Q-Werte zu ermitteln, werden alle relativen Q-Werte einer rho^--Population addiert. Diese Summe (mit * gekennzeichnet) wird gleich 100% gesetzt. Nun wird der prozentuale Anteil der einzelnen Q-Werte ermittelt. Bei Annahme einer Genomlänge von 75 kbp lassen sich aus den numerischen Q-Werten die Längen zwischen betrachteten Teilsegmenten errechnen. Um eine bessere Vergleichbarkeit der physischen Distanzen (letzte Spalte; die Werte sind nach Restriktionsanalysen der mtDNS, zusammengestellt von Grivell 1983, kalkuliert unter Berücksichtigung der Inserts in COB und OXI3, in sog. 'langen' Genen) mit den genetischen Distanzen zu ermöglichen, wird der numerische Q-Wert aller Teilsegmente gemittelt und umgerechnet auf Längen in kbp (vorletzte Spalte).
In Exp. III ist M4490 als OLI1-Marker zur Kalkulation der Distanzen eingesetzt worden.

	Retention		Deletion			
	Häufigkeit		Häufigkeit		Q-Wert	
	absol.	relat.	absol.	relat.		
Gruppe I (M4457)	46	26%	91	51%		
" 12 (M611)	51	29%	80	45%	0,29	0,70
" 15 (M4873)	47	26%	81	46%	0,41	
" 22 (M561)	65	37%	71	40%	0,49	
" 26 (M181)	56	31%	90	51%	0,47	
" 28 (M3013)	36	20%	101	57%	0,55	
" 31 (191)	43	24%	101	57%	0,25	0,84
" 35 (W19)	26	15%	102	57%	0,48	
" 38 (M301)	29	16%	110	62%	0,58	0,71
" 43 (M4494)	26	15%	110	62%	0,07	

Insgesamt 16 solcher rho$^-$-Klone konnten aus früheren Untersuchungen übernommen werden (Schweyen et al. 1977). Sie erlaubten eine Zuordnung der cob$^-$-Mutanten zu maximal 16 Cluster.
Da solche rho$^-$ mit Sequenzendpunkten innerhalb der COB-Region selten in rho$^-$-Populationen nach tsp- oder Mn^{++}-Induktion auftreten, wurde die in Kapitel 2.3. geschilderte Isolierung von rho$^-$-Subklonen angewandt, um weitere in der COB-Region differenzierende rho$^-$ zu erhalten.
Zwei Serien solcher Subklone zeigt Abb. 20.
Insgesamt konnten 78 rho$^-$-Klone und in 11 Serien 62 Subklone zur Kartierung von 153 cob$^-$-Mutationen herangezogen werden.
Wie die Zusammenstellung aller Ergebnisse zeigt (Abb. 19), konnte die Karte der COB-Region wesentlich verfeinert werden: 153 cob$^-$-Mutationen wurden auf 43 Cluster aufgeteilt.
Die Anzahl Mutationen pro Cluster ist sehr variabel. Dies mag eine hohe Dichte von cob$^-$-Mutationen in bestimmten Bereichen der Region wiederspiegeln oder aber ein in bestimmten Bereichen mangelhaftes Auflösungsvermögen der rho$^-$-Kartierung bedeuten.
Überträgt man die für die Kartierung der Gene brauchbare Annahme, dass die Trennungshäufigkeit zweier Marker in etwa proportional ist deren physischem Abstand, so errechnen sich in der COB-Region die grössten Abstände zwischen Gruppen 22 und 23, Gruppen 26 und 28, Gruppen 36 und 38, worauf bereits in Kapitel 2.3.2. detailliert eingegangen wurde.

Tab. 17: Tabellarische Übersicht zu den Retentions- und Deletionshäufigkeiten der Cluster im COB-Gen und den hieraus kalkulierten Distanz-Koeffizienten
(vgl. hierzu auch Abb. 19)

In dieser Tabelle werden die in Abb. 19 aufgeführten Cluster des COB-Gens noch einmal aufgegriffen. Stellvertretend für jedes betrachtete Cluster wird in der ersten Spalte eine Mutante - z.B. M4457 bei Cluster 1 - angegeben. In der gleichen Zeile folgen die für das jeweilige Cluster beobachteten absoluten und relativen Retentions- und Deletionshäufigkeiten.
Die vorletzte Spalte zeigt die Häufigkeit der Trennung zweier in dieser Tabelle untereinander eingetragenen Cluster. Diese wird durch den Distanz-Koeffizienten Q ausgedrückt. Die Q-Werte sind Tab.12 entnommen. Sie reichen von 0,07 - die Trennung zwischen Cluster 38 und 43 anzeigend - bis 0,58 (Trennung zwischen Cluster 35 und 38).
In der äussersten Spalte ist die Häufigkeit der Trennung zwischen weiteren COB-Cluster (angezeigt durch Klammer) angegeben. Da die hier betrachteten Cluster im Gen weiter voneinander entfernt liegen, erreichen die Distanz-Koeffizienten höhere Werte.

Bereich	Anzahl differenzierender rho⁻	$Q_{relat.}$	Q% (3.59) genetische Distanz	errechnete (bp)	physische Distanz (bp)
M4457 (1) - M611 (12)	6 11	0,29	8%	574	415
M611 (12) - M4873(15)	9 14	0,41	11%	789	735
M4873 (15) - M561 (22)	10 20	0,49	14%	1 004	1 014
M561 (22) - M181 (26)	26 7	0,47	13%	932	716
M181 (26) - M3013(28)	22 13	0,55	15%	1 075	1 488
M3013 (28) - M191 (31)	7 7	0,25	7%	502	593
M191 (31) - W19 (35)	13 13	0,48	13%	961	1 050
W19 (35) - M301 (38)	16 8	0,58	16%	1 147	807
M301 (38) - M4494(43)	2 1	0,07	2%	143	352
		3,59*			

Tab. 18: Zusammenstellung der ermittelten genetischen und physischen Distanzen im COB-Gen (vgl. hierzu auch Abb. 19)

Diese Untersuchung erscheint von besonderem Interesse, da die vorliegenden Nukleotid-Sequenzdaten (Lazowska et al. 1980, Jacq et al. 1982, de la Salle et al. 1982, Weiss-Brummer et al. 1982,Schmelzer et al. 1983) eine sehr genaue Angabe zur physischen Distanz liefern können. Tab. 17 bringt die Retentions-/Deletionshäufigkeiten der in diesem Zusammenhang errechneten Q-Werte. Zur besseren Übersicht sind die Q-Werte zusammen mit den genetischen und physischen Distanzen getrennt in Tab. 18 aufgeführt. Bei der Umrechnung der genetischen Distanzen (%) in bp wird die bereits angegebene Länge des COB-Gens - 7 170 bp (Kapitel 2.3.2.) - 100% gleichgesetzt.

Tab. 18 kann die sehr gute Übereinstimmung - in der Mehrzahl der aufgeführten Teilbereiche - zwischen genetischen und physischen Distanzen entnommen werden. Abweichungen sind in Teilbereichen M561 - M181 und M301 - M4494 zu beobachten, die verschiedene Ursachen haben: (a) die experimentell unterschiedlich intensiv gestaltete Suche nach in den einzelnen Teilbereichen trennenden rho$^-$ (vgl. Kapitel 2.3.2.) macht sich hier bemerkbar.
Während im ersteren Fall (M561 - M181) eine möglichst grosse Anzahl differenzierender rho$^-$ für die Feinkartierung erwünscht war, wurde der Teilbereich M301 - M4494 in diesem Zusammenhang etwas vernachlässigt. Dies lässt sich an der sehr niedrigen Anzahl differenzierender rho$^-$

Tab. 18: Zusammenstellung der ermittelten genetischen und physischen Distanzen im COB-Gen
(vgl. hierzu auch Abb. 19)

Zur Ermittlung von genetischen Distanzen im COB-Gen wird die Häufigkeit der Trennung zwischen willkürlich ausgewählten Cluster errechnet. Jedes für diese Betrachtung ausgesuchte Cluster (erste Spalte; Zahl in Klammern) wird durch eine Mutante repräsentiert, d.h. M4457 steht für Cluster 1 und M611 für Cluster 12.
In der folgenden Spalte wird die Anzahl der zwischen den jeweils betrachteten Cluster trennenden rho$^-$ angegeben. Die obere Zahl zeigt rho$^-$ vom Typ X^+Y^o an, während die untere rho vom Typ X^oY^+ anführt (hierbei stehen X und Y für das jeweils betrachtete Clusterpaar). Aus dieser Angabe lassen sich die relativen Distanz-Koeffizienten (Q) gemäss der Formel auf S.70 dieser Arbeit kalkulieren. Diese relativen Q-Werte werden in genetischen Distanzen (Q%) umgerechnet. Hierzu werden alle relativen Q-Werte addiert; diese Summe (= 3,59 in dieser Tabelle, durch * gekennzeichnet) wird gleich 100% gesetzt und nun der prozentuale Anteil für die einzelnen relativen Q-Werte ermittelt.
Diese genetischen Distanzen können in bp ausgedrückt werden, wenn die Gesamtlänge des COB-Gens (7 170 bp) 100% gesetzt wird und die numerischen Werte (= Q%) dementsprechend umgerechnet werden.
Zur Vervollständigung wird in der letzten Spalte die auf Grund von Sequenzierungsdaten ermittelten physischen Distanzen in bp angegeben.

(3; Tab. 18) erkennen. Die unterschätzte genetische Distanz im Teilbereich M181 - M3013 hat jedoch einen anderen Grund. Zwischen Gruppen 26 und 28 liegt eine Strecke von ca. 1 500 bp ohne genetische Marker. Eine genetische Erfassung von $\overline{rho}$, die in diesem Abschnitt beginnen und enden - und solche sind sicherlich vorhanden - ist auf Grund dessen unmöglich. Die beobachtete Trennungshäufigkeit liegt somit unter der tatsächlichen, und dies führt bei der Kalkulation der genetischen Distanz zu einer Unterschätzung.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Resultat dieser genetischen Analyse von Distanzen sehr zufriedenstellend ist. Die Übereinstimmung zwischen auf gänzlich unterschiedlichen Wegen ermittelten Abstände ist überraschend gut. Es ist anzunehmen, dass eine weitere Auflösung mit $\overline{rho}$ zu exakteren genetischen Distanzen führen würde.

IV. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit präsentiert eine Serie von Analysen zur Marker-Retention in rho$^-$-Klonen, die erstmals ausreichend ist, um statistisch gesicherte Aussagen zur Verteilung der Endpunkte von rho$^-$mtDNAs auf dem Gesamt-Genom von S. cerevisiae als auch zur präferentiellen Retention einzelner Genomsegmente zuzulassen.

Die Aussagen stützen sich auf rho$^-$-Populationen, die von 6 verschiedenen rho$^+$-Stämmen nach unterschiedlicher mutagener Behandlung (Ethidiumbromid, Manganchlorid, Wachstum von zwei Mutanten mit temperaturabhängiger hoher Rate der rho$^-$-Bildung bei 36^oC) erzielt wurden. Die Ergebnisse unterscheiden sich nur in Nuancen. Die hier als wesentlich ausgearbeiteten Parameter wie Retention verschiedener Segmente des mitochondrialen Genoms und Häufigkeit der Endpunkte der rho$^-$-mtDNS in verschiedenen Segmenten sind in verschiedenen Populationen vergleichbar, so dass eine separate Diskussion einzelner Populationen unterbleiben kann.

Endpunkthäufigkeit

Im genetischen Test kann naturgemäss nur die Retention oder das deletionsbedingte Fehlen genetischer Marker festgestellt werden. Die Lage eines rho$^-$-mtDNS-Endpunktes wird beispielsweise bei einer rho$^-$ des Genotyps $K^+L^+M^oN^o$ als in dem von L und M begrenzten Genomsegment liegend angenommen. Eine derartige Lagebestimmung ist limitiert durch die ungleiche Verteilung prüfbarer genetischer Marker: manche Regionen des Genoms sind dicht besetzt, z.B. das COB-Gen mit mindestens 43 Mutationsorten auf einer Länge von 7 170 bp, während in anderen Regionen wie ERY-M4696, PAR-OXI2 auf einer Länge von ca. 10 000 bzw. 12 000 bp keine Marker verfügbar sind.
In der vorliegenden Arbeit wurde dementsprechend die Häufigkeit von rho$^-$-mtDNS-Endpunkten (a) in 13 Teilsegmenten des Gesamtgenoms und (b) in Teilsegmenten des COB-Gens berechnet und die Werte in Relation gesetzt zu den physischen Längen der Teilsegmente (Tab. 15, 16, 18), die exakt oder in guter Annäherung bekannt sind.
Wie in Kapitel 2.3.2. ausgeführt, errechnet sich im COB-Gen (7 170 bp) eine (minimale) mittlere Endpunkthäufigkeit der rho$^-$mtDNS von Subklonen von 1,6 pro 100 bp; für Exonsequenzen (1 164 bp codierend

für Apocytochrom b) ist dieser Wert am eindeutigsten bestimmt: die minimale Zahl molekular verschiedener Endpunkte ist 19 pro 1 164 bp. Unter der Annahme, dass unabhängig entstandene rho^--Subklone molekular verschiedene Endpunkte haben, errechnet sich eine maximale Zahl von 79 pro 1 164 bp oder im Mittel 1 Endpunkt pro 15 bp. Die Verteilung der Endpunkte der untersuchten Populationen von rho^- über Exon- und Intronsequenzen ist recht einheitlich wie die Berechnung der Endpunkthäufigkeiten in 11 Teilsequenzen des COB-Genes zeigt (Tab. 8).

Bei Betrachtung des Gesamtgenoms ergibt sich ein ähnlicher Befund: in 4 Populationen von rho^--Sekundärklonen (gewonnen aus rho^+ nach Mutagenese) sind die Endpunkthäufigkeiten in 12 Zwischen-Gen-Bereichen (mit Ausnahme von M4696 - OLI1) annähernd gleich (Tab. 4a,4d). Deutlich geringer sind die Endpunkthäufigkeiten innerhalb der COB-Genregion und der OXI3-Genregion. Für letztere wurde auch eine relativ geringe Retention gefunden (Abb. 16). Doch zeigte sich in der quantitativen Kartierung des Genoms (Kapitel 5.1.), dass die Trennungshäufigkeit (= rho^--mtDNS-Endpunkthäufigkeit) auch nach Korrektur für die geringere Retention der OXI3-Region in rho^--Populationen auffallend gering ist. In der quantitativen Kartierung wird dies an einer Unterschätzung der Länge der OXI3-Region und der COB-Region erkennbar (vgl. Kapitel 5.1. und Tab. 16).

Diese auffallend geringe Häufigkeit der rho^--Endpunkte innerhalb der COB- und OXI3-Regionen im Verhältnis zu anderen Genomsegmenten mag damit zusammenhängen, dass dies zwei "split genes" sind (Distanzen von ca. 6 000 bzw. 10 000 bp zwischen den beobachteten Markern); ihre Introns enthalten (mit wenigen Ausnahmen) offene Leserahmen. Die COB- und OXI3-Genomsegmente enthalten daher einen überdurchschnittlichen G+C-Gehalt von ca. 30% (Mittel 18% für S. cerevisiae mtDNS, Bernardi et al. 1970).

Die übrigen untersuchten Genomsegmente umfassen mehr oder weniger lange Zwischen-Gen-Sequenzen mit extrem niedrigem G+C-Gehalt ($<5\%$, Bernardi et al. 1970, Prunell et al. 1974). Höhere Endpunkthäufigkeit könnte also mit dem Anteil der codierenden Sequenzen, möglicherweise mit deren höherem A+T-Gehalt und den G+C-Clusters korrelieren.

Ein Genomsegment zeigt besonders hohe Endpunkthäufigkeit: M4696-OLI1.

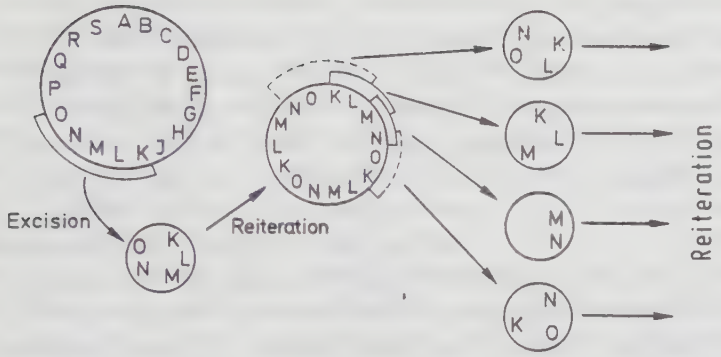
Dies ist nicht nur bei allen Populationen der Sekundärklone, sondern auch bei Subklonen der rho$^-$ des Genomsegmentes TSM- CAP/ERY-M4696 - OLI1- COB (Kapitel 2.2. und Abb. 18) beobachtet worden. Da die Distanz M4696-OLI1 bekannt ist (1 100 bp, Sequenzanalyse am Stamm D 273-10B, Tzagoloff et al. 1980) sind die standardisierten, sehr hohen Werte verlässlich, ebenso wie die geringen Werte für die ebenfalls in molekularer Grösse bekannten Segmente COB und OXI3.

Bernardi und Mitarbeiter und Sor und Fukuhara (1983) haben molekulare Daten gesammelt für die Hypothese der spontanen Bildung von rho$^-$-mtDNS-Genomen durch (1) Excision einer mtDNS-Sequenz aus rho$^+$ oder rho$^-$ durch illegitime Rekombination, (2) Amplifikation dieser Sequenz (vgl. Abb.1). Nach dieser Hypothese markieren die zwei Endpunkte einer rho$^-$-mtDNS Sequenzen im Genom, die über eine kurze Folge von Basen (teil-)homolog sind (tandem rho$^-$mtDNS) oder kurze Palindrome aufweisen (palindrome rho$^-$mtDNS) (Baldacci et al. 1980, Gaillard et al. 1980, Bonitz et al. 1980b, Thalenfeld et al. 1980, Sor et al. 1983).
Bei Nukleotidanalyse von tandem rho$^-$mtDNS (Gaillard et al. 1979, Thalenfeld et al. 1980, Bonitz et al. 1980, Sor et al. 1983) wurden solche Endpunktsequenzen in 21 Fällen bestimmt.
Die weniger komplexen Spacer-Sequenzen, die fast ausschliesslich aus A+T mit eingestreuten GC-Clusters bestehen, lassen eine grössere Häufigkeit kurzer homologer Sequenzen erwarten als die Gensequenzen mit ca.30%G+C. Sie dürften sogar nach Bernardi (1979, Review) typische und - über den statistisch erwarteten Wert hinaus - häufige Elemente der Spacer sein und für illegitime Rekombinationsereignisse genützt werden. Die hier vorliegenden Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit diesem Modell der rho$^-$-Bildung: in Gensequenzen (COB und OXI3) ist die Häufigkeit von rho$^-$mtDNS-Endpunkten relativ geringer als in den langen Genomsegmenten mit grossem Anteil an Spacersequenzen.
Die bisher molekular untersuchten rho$^-$mtDNS-Endpunkte markieren tandem repeats der rho$^+$-mtDNS von 4 bis 23 Basenpaaren ohne oder mit nur 1 mismatch (Baldacci et al. 1980, Gaillard et al. 1980, Sor et al. 1983). Nun kommt die vorliegende Arbeit zu dem Ergebnis, dass in Exon-Sequenzen der COB-Region (von 1 164 bp Länge) mindestens 19, möglicherweise 79 verschiedene rho$^-$mtDNS-Endpunkte vorhanden sein können. Der Hypothese der illegitimen Rekombination zur Folge

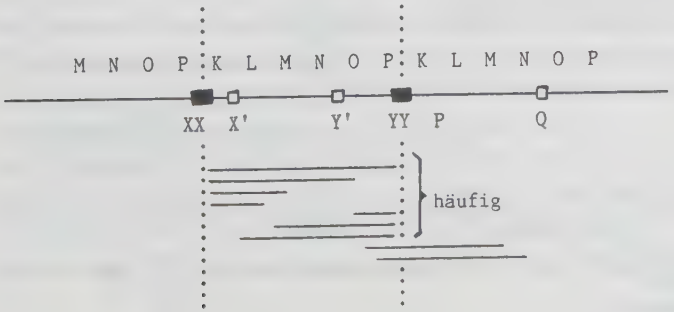
besitzt jeder dieser Endpunkte ein homologes, in tandem angeordnetes Gegenstück, meist innerhalb oder aber in der Nähe der COB-Region. Daraus ist abzuleiten, dass diese Hypothese nur aufrechterhalten werden kann, wenn die Länge der tandem repeats kürzer als 10 bis 15 bp sein darf oder mehr als 1 mismatch enthalten darf.

Kartierung

Als Alternative zur Rekombinationskartierung konnte die Deletions- bzw. Retentionskartierung, basierend auf der Analyse in rho^--Klonen zurückbehaltener Marker, als überraschend genaue Methode zur Lokalisierung von Markern und Ermittlung von Genabständen, die vergleichbar mit physischen Daten sind, verwendet werden. Zur Demonstration kann Abb. 4 herangezogen werden, die eine circuläre Karte des mitochondrialen Genoms darstellt mit Angabe der durch genetische Methoden ermittelten Abstände und - zum Vergleich - der physischen Abstände.
Mit gleicher Genauigkeit liessen sich Marker,und deren Abstände innerhalb einer Genregion (COB, ca. 7 000 bp lang, 43 Mutationsorte,Abb.19) durch Analyse der Coretention von Markern in rho^--Subklonen bestimmen. Damit erweist sich die rho^--Retentionskartierung als gleichermassen geeignet für die Kartierung von Markern verschiedener Gene wie auch von Markern innerhalb einer Genregion. Für diese Feinkartierung ist eine Voraussetzung die grosse Häufigkeit von möglichen Endpunkten der rho^--mtDNS-Sequenz, die weiter oben bereits diskutiert als >1 pro 100 bp ist. Eine weitere Voraussetzung ist die Bildung kontinuierlicher mtDNS-Segmente bei der Mutation $rho^+ \longrightarrow rho^-$ und weiterhin bei der Bildung von rho^--Subklonen ($rho^-_{KLMN} \longrightarrow rho^-_{MN}$).
Im einfachsten Fall einer tandem organisierten mtDNS durch illegitime, intramolekulare Rekombination (Bernardi 1979, Review; Marotta et al. 1982, de Zamaroczy et al. 1982) ist die Wahrung der Sequenzkontinuität im primären Ereignis verständlich, jedoch nicht im sekundären Ereignis der Subklonierung: es ist nicht offensichtlich, warum entsprechend unten stehendem Schema nicht Subklone mit kontinuierlichen Sequenzen des rho^+-Genoms (KLM, MN u.a.) und nicht-kontinuierliche Sequenzen (NOKL, OK,u.a.)



entstehen. Die hier vorgelegten Ergebnisse sprechen klar für eine hohe Präferenz kontinuierlicher Subklon-Sequenzen (vgl. Kapitel 1.3.1. und 1.4.). Einzig der Befund, dass Subklone häufig ein Ende der rho$^-$-Mutterklonsequenz bewahren (soweit dies durch Marker-Analyse erkennbar ist) gibt einen Hinweis darauf, dass die im ersten Mutationsschritt beteiligten Sequenzen X und Y erneut am zweiten Schritt teilnehmen, z.B. indem X mit X' und Y mit Y' im Sinne illegitimer Rekombination in Interaktion tritt. Diese Sequenzen X und Y sind möglicherweise für dieses Ergebnis bevorzugte Oligonukleotidsequenzen, etwa im Vergleich zu P und Q (s. unteres Schema). Diese Frage zu untersuchen, erfordert die Sequenzierung der DNS-Endsequenzen einiger Familien von rho$^-$-Subklonen.

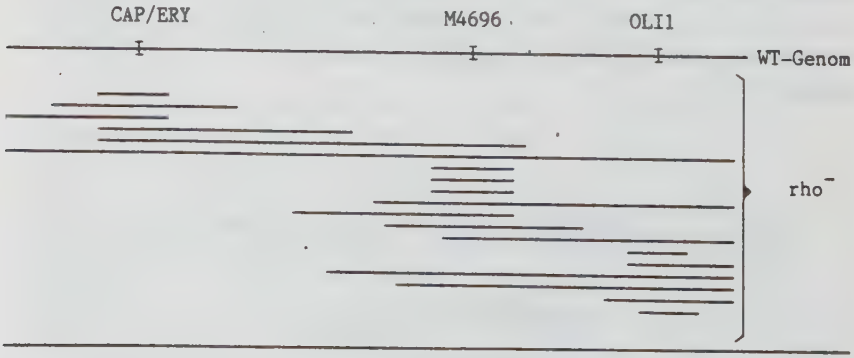


Einige Restriktionsanalysen ausgewählter rho$^-$-Klone (Jacq et al. 1980, Grosch et al. 1981, Perlmán et al. 1980) sowie Sequenzierungen (Bonitz et al. 1980b,Thalenfeld et al. 1980, Sor et al. 1983) belegen molekular die Richtigkeit der hier genetisch erfassten Gesetzmässigkeit des Überlebens kontinuierlicher Segmente des mitochondrialen Genoms in rho$^-$-Klonen. Nur eine Analyse (Morimoto et al. 1976) steht im Widerspruch dazu. Eine Erklärung mag darin liegen, dass die von diesen Autoren studierten rho$^-$ nach EB-Behandlung von rho$^+$-Zellen isoliert worden waren. Diese Behandlung bedingt nach Ansicht anderer Autoren eine besondere rho$^-$-Entstehung (vgl. Sor et al. 1983, Bernardi 1979, Review).

Die genetische Analyse der Marker-Distanzbestimmung führte zu einer Unterschätzung der Längen der grossen Gene COB und OXI3; wie oben ausgeführt, mag dies bedingt sein durch eine geringere Häufigkeit möglicher rho$^-$mtDNS-Endpunkte in diesen vergleichsweise G+C-reichen und auf Kodierungsfunktionen hin evolutionierten Sequenzen.

In der OXI3-Region war allerdings auch die Genauigkeit der Bestimmung durch die geringe Zahl von in diesem Bereich endenden rho$^-$mtDNS trotz Korrektur (vgl. Kapitel 5.1.) geringer als in anderen Bereichen.

Auch die Additivität der genetischen Distanzen war nicht in allen Fällen gegeben. Dies gilt vor allem für Abschnitt CAP/ERY-OLI1 in einigen untersuchten rho$^-$-Populationen (Exp. III und IV). Die Ursache dürfte in der zu geringen Dichte und ungleichen Verteilung der Marker liegen wie folgendes Schema verdeutlichen soll:



CAP/ERY$^+$ OLI1^o	5	13	nach Korrektur		5+5	23
CAP/ERY^o OLI1$^+$	8				8+5	
CAP/ERY$^+$ M4696^o	4	13	"		4+0	13
CAP/ERY^o M4696$^+$	9				9+0	
M4696$^+$ OLI1^o	5	9	"		5+0	9
M4696^o OLI1$^+$	4				4+0	

Die Gesamtdistanz CAP/ERY-OLI1 errechnet sich in diesem Beispiel als etwa gleich den Teildistanzen CAP/ERY-M4696 und M4696-OLI1. Die Zurechnung der rho$^-$, die beide Endpunkte innerhalb CAP/ERY-OLI1 haben, führte zu klarer Additivität. (Dies ist analog dem Problem der Doppel-Cross-Over und dem Phänomen der negativen Interferenz). Bei den hier studierten rho$^-$-Populationen ergibt sich dieses Problem vor allem im Bereich CAP/ERY-OLI1, weil rho$^-$, die nur M4696 tragen, relativ häufig sind (Abb. 6, 8, 9). Bei Berechnung der Trennungshäufigkeiten von CAP/ERY-OLI1 wurden sie nicht in die Kalkulation mit einbezogen, wurden wohl aber bei Berechnung der Einzeldistanzen berücksichtigt. Es könnten nun zur Korrektur alle nur M4696 tragenden rho$^-$ doppelt mitgezählt werden, was die Additivität herstellen würde. Zur Wahrung der Analogie der Kalkulation von Trennungshäufigkeiten und Rekombinationshäufigkeiten wurde auf diese Berechnung verzichtet. Die Bestimmung der Marker-Distanzen ist davon nicht betroffen, da Teildistanzen (CAP/ERY-M4696, M4696-OLI1) bestimmt wurden.

Marker-Retention

Wie bereits eingangs erwähnt, kann die vorliegende Arbeit detaillierte Angaben zum Retentionsverhalten von rho$^-$ in mutagen induzierten und spontanen Populationen machen. Alle Regionen des mitochondrialen Genoms werden im Mittel von 4 Populationen mit etwa gleicher Häufigkeit zurückbehalten (Tab. 3 und Abb. 15). Ausnahmen stellen die OXI3-Region und OLI2-Region mit niedriger (19%-42% und 26%) und der Bereich M4696-OLI1-COB mit hoher Retention dar (63% bis 92%).
Bei Betrachtung dieser Daten stellt sich die Frage, worin dieses unterschiedliche Retentionsverhalten begründet sein könnte. Es bieten sich zwei Möglichkeiten der Erklärung an:

a) Dem primären Ereignis der rho$^-$-Entstehung liegt ein selektiver Mechanismus zu Grunde, der die Bildung bestimmter rho$^-$-Genomsegmente (Excision aus rho$^+$, Reiteration) bevorzugt oder benachteiligt. Die nascierenden rho$^-$-Zellen weisen schon den an etablierten Klonen nachgewiesenen Unterschied der Marker-Retention auf.
b) Alle Genomsegmente liegen zunächst in den nascierenden rho$^-$-Zellen mit gleicher Häufigkeit als rho$^-$"repeat unit" vor. Es sind sekundäre Ereignisse bei der Segregation und der Vermehrung der rho$^-$ - es vergehen $\gg$20 Generationen bis zur experimentellen Erfassung

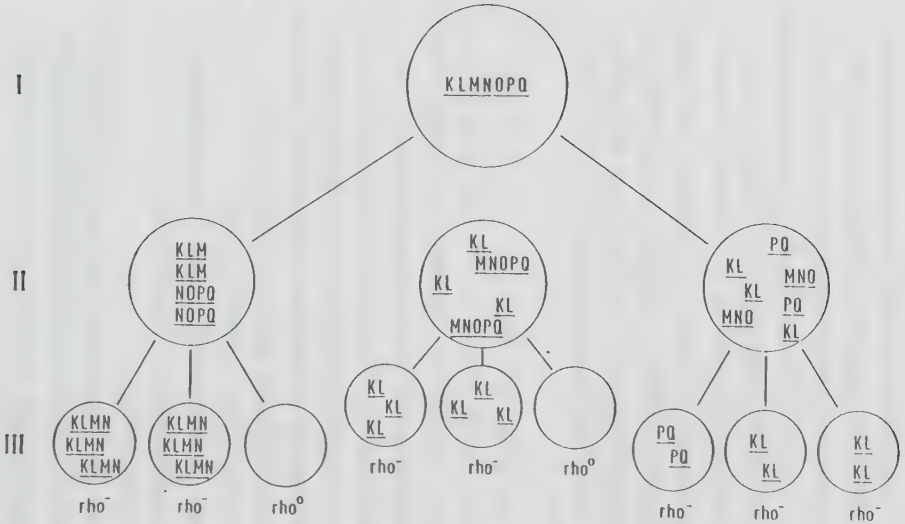


Abb. 27: Schematische Darstellung der präferentiellen Retention nach Hypothese b

I rho⁻-Mutterzelle mit ihrem mtDNS-Genom bzw. 'repeat unit' K.L.M.N.O.P.Q.,
II Nachkommen mit sekundären rho⁻-Ereignissen, die ein heteromitochondriales Zwischenstadium bilden (z.B. rho⁻ K.L.M. und rho⁻ N.O.P.Q.),
III homomitochondriale Nachkommen (rho⁻ oder rho°) nach Segregation der heteromitochondrialen Zellen (z.B. rho⁻ K.L. oder rho⁻ P.Q. oder rho⁻ K.L.M.N.).

des rho⁻-Genotyps - die zu dieser Verschiebung der Retention mitochondrialer Marker führen.

Untersuchungen an nascierenden rho⁻, von Backhaus et al. (1978) durchgeführt, liegen vor, die gegen eine selektive rho⁻-Entstehung sprechen: rho⁺-Zellen wurden Bedingungen ausgesetzt, die zu rascher rho⁻-Bildung führen; während einer Behandlungsdauer von mehreren Zellgenerationen wurde der Verlust mitochondrialer Marker in dieser Population nascierender rho⁻ durch Kreuzung mit einer Tester-Kollektion geprüft. Dieser experimentelle Ansatz erlaubt die Annahme, dass diese rho⁻ zum Zeitpunkt ihrer Entstehung und nicht erst nach Etablierung als rho⁻-Klone erfasst werden konnten. Die Autoren haben zwar keinen OXI3-Marker getestet, aber den Marker PAR, der verglichen mit anderen mitochondrialen Testern bei etablierten rho⁻ ebenfalls geringe Retention zeigt (Tab. 3 und Abb. 15). Die Autoren fanden, dass die Retention aller drei getesteten Marker - CAP, OLI1, PAR - in solchen nascierenden rho⁻-Populationen in gleichem Masse abnimmt und zwar bis zum totalen Verlust. Ein unterschiedliches Retentionsmuster, wie beispielsweise in Abb. 16 aufgezeigt, war nicht zu beobachten. Daraus ist zu schliessen, dass in Populationen nascierender rho⁻-Zellen verschiedene Genomsegmente den gleichen Grad der Retention bzw. Deletion zeigen. Die unterschiedliche Retention in etablierten rho⁻-Klonen, wie sie hier geprüft wurden, muss also sekundär durch bevorzugten Verlust des Genomsegmentes OXI3 und Nachbarsequenzen im Laufe der Vermehrung von rho⁻mtDNS bis zur Klon-Isolierung bedingt sein.

Argumente gegen eine Selektivität im primären Ereignis der rho⁻mtDNS-Bildung liefern auch Daten aus der vorliegenden Arbeit (Tab. 4): hier werden rho⁻, die OXI3 zusammen mit anderen Genomsegmenten zurückbehalten, subkloniert. Diese Vorgehensweise, die eine reine Zellvermehrung darstellt mit spontaner Bildung von rho⁻-Subklon-DNS , führt zu dem Ergebnis, dass alle drei untersuchten rho⁻-Klone einen selektiven Verlust der in der rho⁻-Mutterzelle vorhandenen OXI3-Region zeigen. Es ist anzunehmen, dass aus der Mutter-rho⁻mtDNS mehrere verkürzte Tochter-mtDNS-Moleküle hervorgehen, also primär heteroplasmische rho⁻-Populationen in den Zellen entstehen (vgl. Abb. 27). Bei der dann ablaufenden Vermehrung kommt es zum bevorzugten Überleben derjenigen rho⁻, die OXI3 zusammen mit anderen Genomsegmenten enthalten und/oder allein andere Genomsegmente ohne OXI3 zurückbehalten haben. Ähnliche Ergebnisse haben Fukuhara et al. (1977) erzielt.

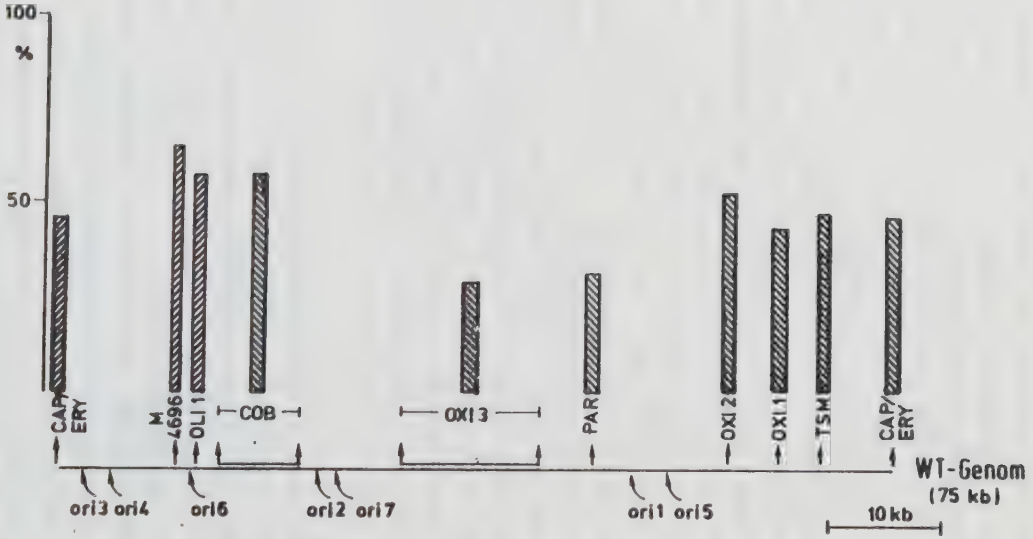


Abb. 28: Korrelation zwischen Retentionshäufigkeit und bekannten ori-Sequenzen auf dem mitochondrialen Genom

Das mtDNS-Molekül wird als horizontale Linie wiedergegeben mit den 7 bisher beschriebenen ori-Sequenzen. Die Ordinate zeigt die Häufigkeit der Retention der im Rahmen dieser Arbeit geprüften Genregionen bzw. Marker.

Das gleiche heteromitochondriale Zwischenstadium stellt eine nascierende rho^-, entstanden nach Mutagenese einer rho^+-Zelle, dar. Sie mag (nach Hypothese b, S.87) primär entstandene rho^-mtDNS-Moleküle verschiedener Genomsegmente (und noch rho^+mtDNS-Moleküle) enthalten. Im Laufe der Vermehrung bis zur Sekundärklonbildung kommt es zur Benachteiligung der rho^-mtDNS, die nur das OXI3-PAR-Segment tragen.

Worin liegt die Bevorzugung/Benachteiligung bestimmter rho^-mtDNS-Genomsegmente begründet? Einiges spricht für die Hypothese, dass Segmente mit ori-Sequenzen (putative Replikations-Initiations-Sequenzen, Bernardi 1979 & 1982, Reviews) eine höhere Überlebenschance haben als andere Segmente:

a) Ein Blick auf das in Abb. 28 gezeigte Blockdiagramm lässt eine Korrelation zwischen Vorhandensein/Fehlen einer ori-Sequenz und hoher/niederer Retention eines Genomsegmentes in rho^--Klonen erkennen.

b) Von Bernardi und Mitarbeitern untersuchte rho^-, die sie spontan in Hefepopulationen vorfanden, waren häufig kurz und trugen eine der 7 ori-Sequenzen der rho^+mtDNS (de Zamaroczy et al. 1979, Gaillard et al. 1979, de Zamaroczy et al. 1981).

c) Solche kurzen, ori-Sequenzen tragenden rho^--Klone verhalten sich in Kreuzungen mit rho^+-Zellen als suppressiv (s. Kapitel 3 dieser Arbeit). Molekulare Studien führten zu dem Schluss, dass diese rho^- mtDNS wegen der durch Reiteration vervielfältigten Zahl an ori's in der heteromitochondrialen Zygote und deren Nachkommen (rho^-/rho^+)) viel rascher vermehrt wird als die rho^+mtDNS und somit nach Segregation in homomitochondrialen Zellen weit überwiegt (z.B. 95% rho^-, 5% rho^+; Sena et al. 1981). Daraus ergibt sich abschliessend folgende Modellvorstellung:

In heteromitochondrialen Zellen wie Zygoten nach Kreuzung oder nascierenden rho^--Zellen hängt die Vermehrungsgeschwindigkeit der verschiedenen mtDNS-Moleküle (rho^- und rho^+ oder rho_1^- und rho_2^-) von der Zahl der ori-Sequenzen pro Länge der mtDNS ab. Die Nachkommenschaft wird entsprechend einen mtDNS-Typ bevorzugt aufweisen. Die Bevorzugung wird nur erkennbar, wenn zwei rho^-mtDNS-Moleküle in Konkurrenz um die Replikation treten, also nur im Falle heteromitochondrialer Zellen. Nach Segregation mögen sie in homomitochondrialen Zellen gleiche Replikationschancen haben.

Bei der Vielzahl möglicher mtDNS-Segmente, die wie in dieser Arbeit gezeigt in rho^--Klonen überleben können (vgl. etwa COB-Region, Kapitel 2.3.2.) ist allerdings zu fordern, dass Segmente ohne einen

der 7 ori's mehr oder weniger ähnliche Sequenzen (surrogate ori's, Goursot et al. 1982) für die Replikation genützt werden. Nur in Konkurrenz mit typischen ori's tragenden mtDNS-Molekülen könnte ihr eventueller Replikationsnachteil geprüft werden.

V. Zusammenfassung

Die Charakterisierung der rho$^-$-Mutation, eines bei Saccharomyces cerevisiae bekannten Deletionsprozesses der mitochondrialen DNS, wurde durch die Analyse der Retention mitochondrial genetischer Marker an verschiedenen Populationen von rho$^-$-Klonen versucht:

1) Nach mutagener Behandlung von rho$^+$-Zellen wurden neun Populationen von rho$^-$-Klonen isoliert; die Retention von Markern aller Genomregionen wurde bestimmt.
2) Von einigen dieser rho$^-$-Klone wurden Subklone isoliert, deren mtDNS weitere rho$^-$-Deletionen erfahren hatten. An solchen Populationen wurde die Retention von Markern eines Genomsegmentes bestimmt.

Die Ergebnisse von (1) und (2) lassen übereinstimmend folgende Schlüsse zu:

a) die zurückbehaltenen mtDNS-Segmente stellen kontinuierliche Segmente des Wildtyp-Genoms dar; dies trifft selbst dann zu, wenn rho$^-$-Klone nach mehreren Passagen der Subklonierung studiert wurden.
b) Beliebige grössere oder kleinere Teile des mitochondrialen Genoms können deletiert bzw. in rho$^-$-Zellen zurückbehalten werden.
c) Es gibt eine Vielzahl von verschiedenen Endpunkten der rho$^-$-mtDNS-Sequenzen, also eine Vielzahl potentieller rho$^-$-Deletionspunkte. Für eine Genomregion wird ihre Häufigkeit als 10 pro 1000 Basenpaare errechnet.
d) Die Retentionshäufigkeit verschiedener mitochondrialer Genomsegmente in einer rho$^-$-Population ist weitgehend gleich; nur das Segment OLI2-OXI3-PAR zeigt deutlich geringere Häufigkeit.

Hochsuppressive rho$^-$ (hs petites) wie sie von anderen Arbeitsgruppen in den letzten Jahren im Zusammenhang mit Studien zum Replikationsorigin beschrieben wurden, treten nur selten nach den hier angewandten mutagenen Behandlungen auf. Solche hs-rho$^-$ konnten nur nach spezifischer Selektion gefunden werden. Molekulare Untersuchungen ihrer mtDNS zeigen, dass sie (wie die bereits früher beschriebenen) ori-Sequenzen tragen.

Die Befunde (a) bis (c) charakterisieren die rho$^-$-Klone als geeignet für die Deletionskartierung des mitochondrialen Genoms. Eine derar-

tige Kartierung wird durchgeführt für alle verfügbaren Marker des mitochondrialen Gesamt-Genoms und für eine grosse Zahl von Markern der COB-Region. Die rho$^-$-Kartierung erweist sich als ausgezeichnet geeignet zur quantitativen Kartierung, d.h. zur Bestimmung relativer Markerabstände.
An einer der so erstmals kartierten Mutationen, M4696, wird versucht mittels molekularbiologischer Studien den funktionellen Defekt zu bestimmen. Es werden Hinweise auf eine Störung der Reifung der mitochondrial kodierten $tRNA^{ser}$ gefunden.

A N H A N G

Abb. 6-1 : Verteilung von Genomsegmenten in rho$^-$-Populationen aus Exp. I-IX (vgl. auch Tab. 1)

Die im Experiment erhaltenen rho$^-$ werden durch horizontale Linien symbolisiert. Die rho$^-$-Populationen unterteilen sich in einfach und mehrfach deletierten Mutanten, wobei letztere etwas abgesetzt im unteren Teil der Abbildungen wiedergegeben werden.
Über jeder rho$^-$-Population ist das mitochondriale Genom mit seiner Aufeinanderfolge von untersuchten genetischen Markern - z.B. CAP/ERY, PAR, M4696 usw. - wiedergegeben. Um auf die Circularität des mitochondrialen Genoms hinzuweisen, wird der in dieser Darstellung links stehende Marker - z.B. CAP (Abb. 6) oder COB (Abb. 10) - noch einmal als äusserster rechter Marker aufgeführt.

Tab. 3: Retentionshäufigkeiten (VB 95%) der in Exp. I-IV untersuchten Marker (vgl. hierzu auch Tab. 1)

Die Gesamtzahl ( ) der getesteten Klone versteht sich unter Ausschluss aller petites, die mit keinem der eingesetzten Marker Rekonstitution zeigen (rho^0 oder heteromitochondriale rho$^-$).

Tab. 11-14: Tabellarische Wiedergabe der Trennungshäufigkeiten (absolute und relative Q-Werte) ermittelt an Hand von rho$^-$-Populationen aus Exp. I-IV (vgl. auch Tab. 1).

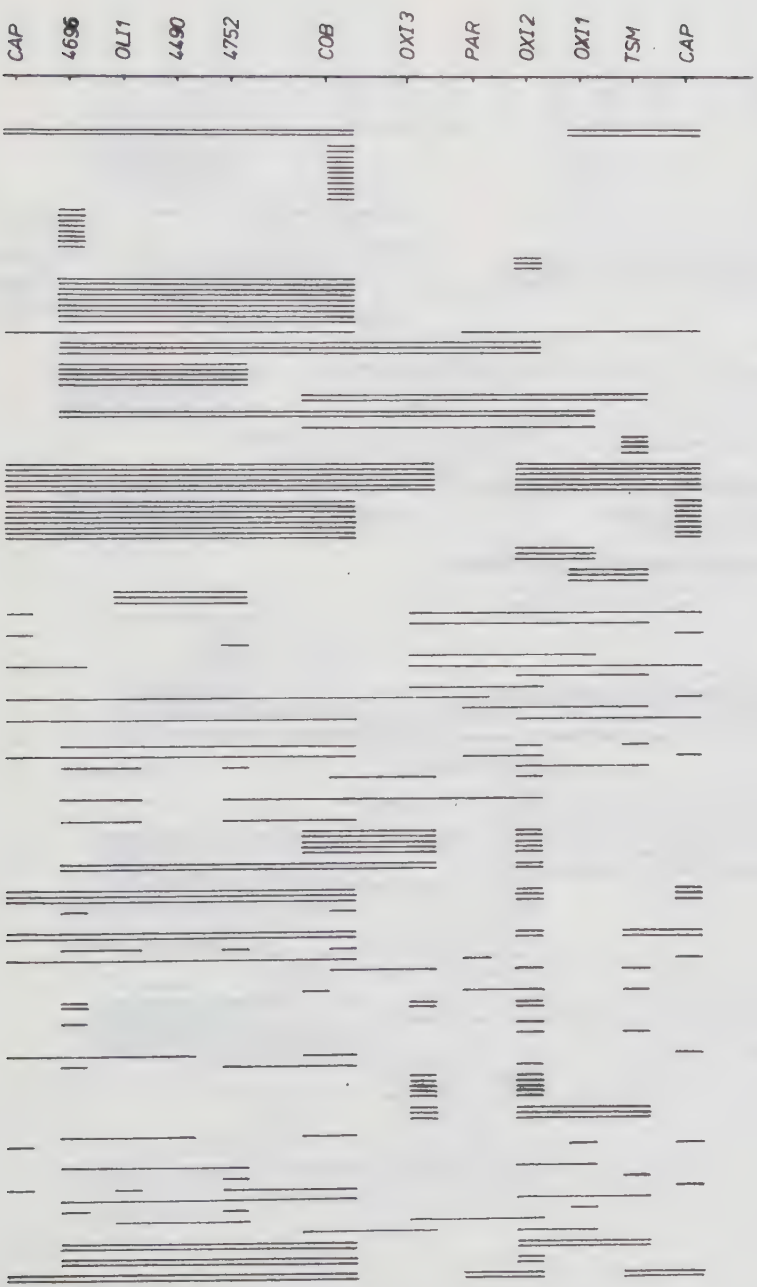


Abb.6
KL14-4A
15µg/ml EB
Exp. I

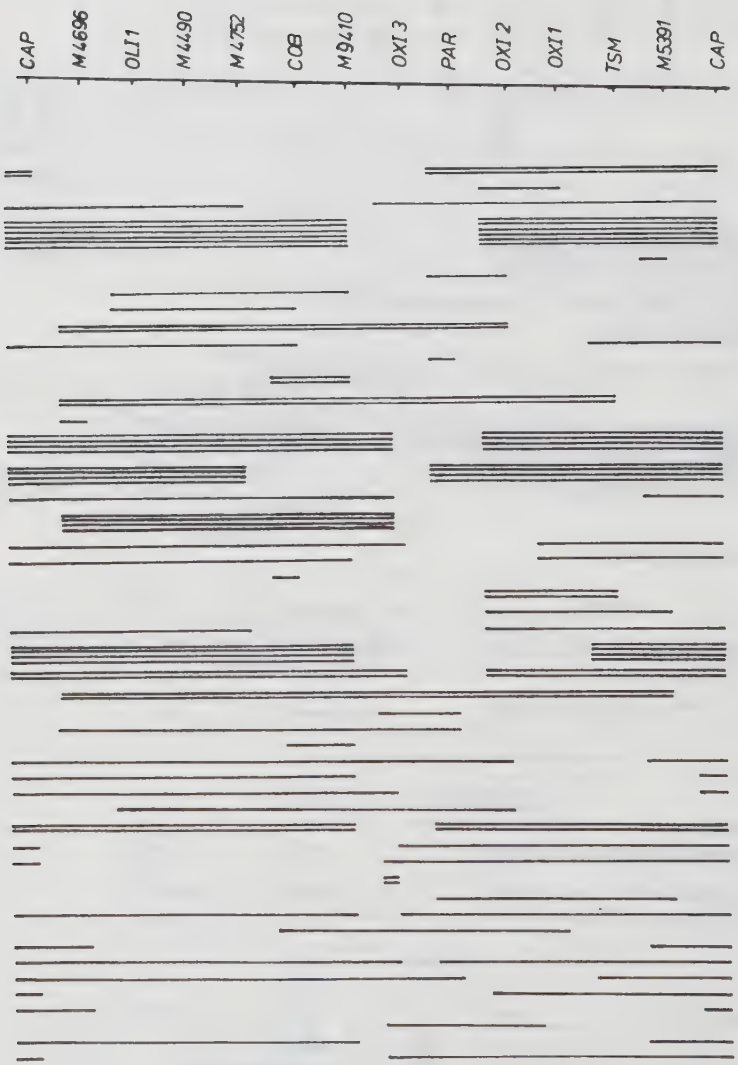


Abb. 7
KL14-4A
30µg/ml
Exp. II

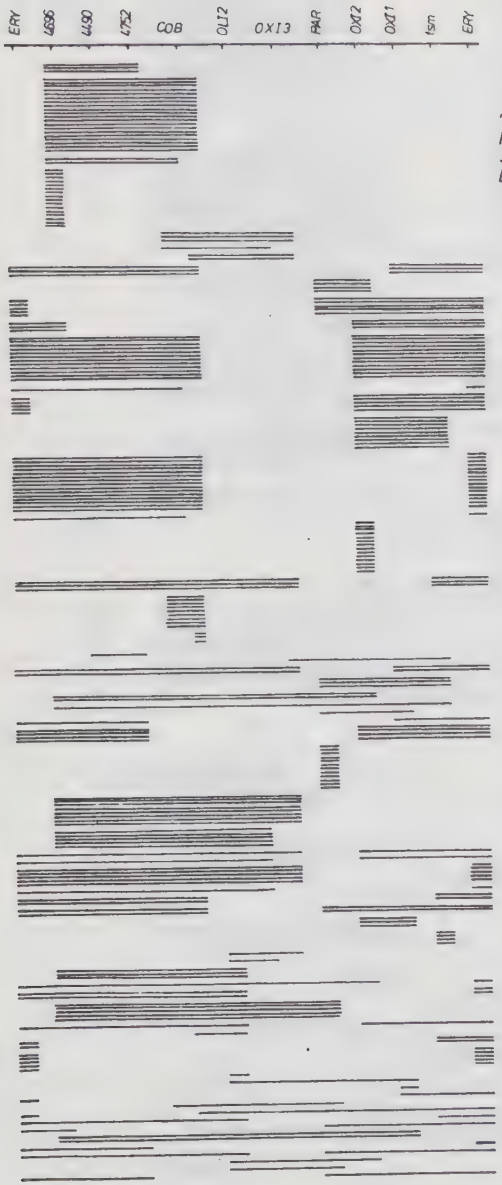


Abb.8
RM 511-4A
30µg/ml EB
Exp. III

Abb.9
RM 590-9D
500 µg/ml $MnCl_2$ +36°C
Exp IV

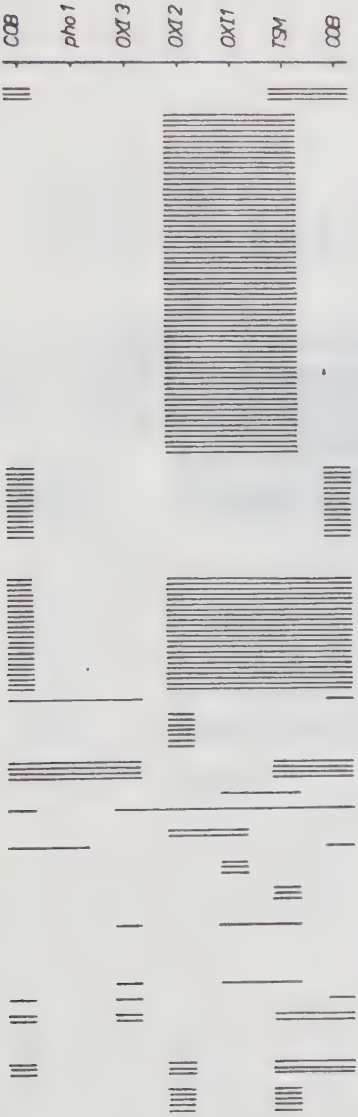


Abb. 10
RM 511-4A
250 µg/ml $MnCl_2$
Exp. V

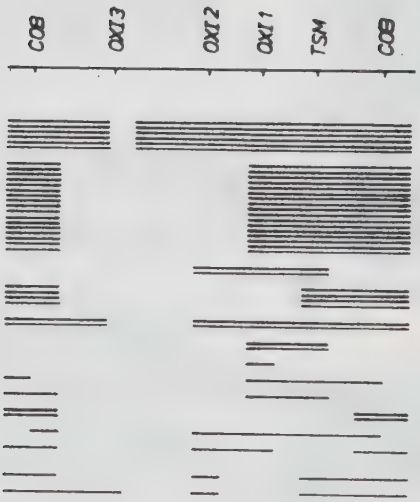


Abb.11
M121WT
750 µg/ml $MnCl_2$
Exp.VI

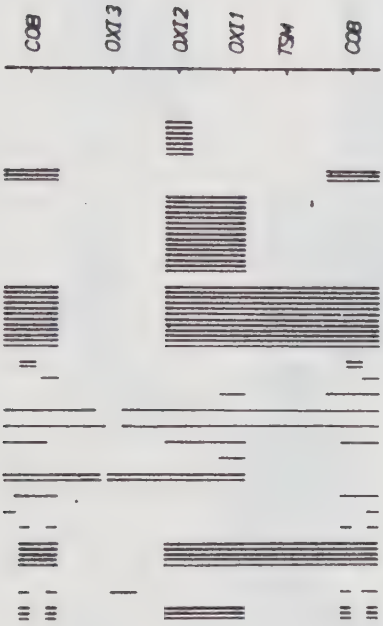


Abb. 12
M 121 WT
1200 µg/ml
Exp. VII

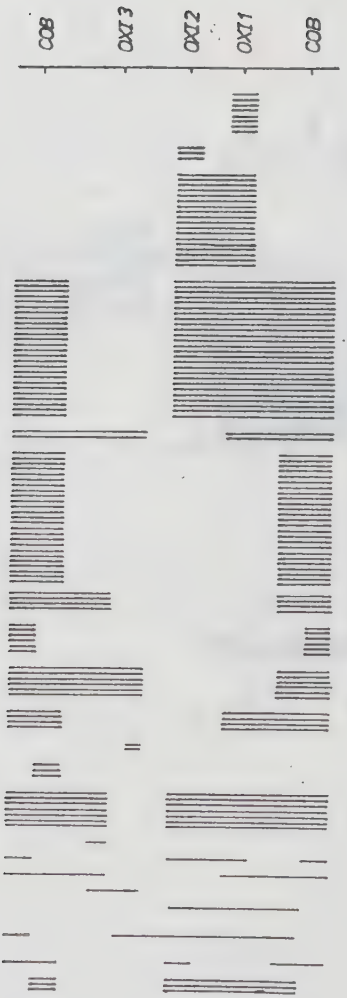


Abb. 13
M 1218
36°C
Exp. VIII

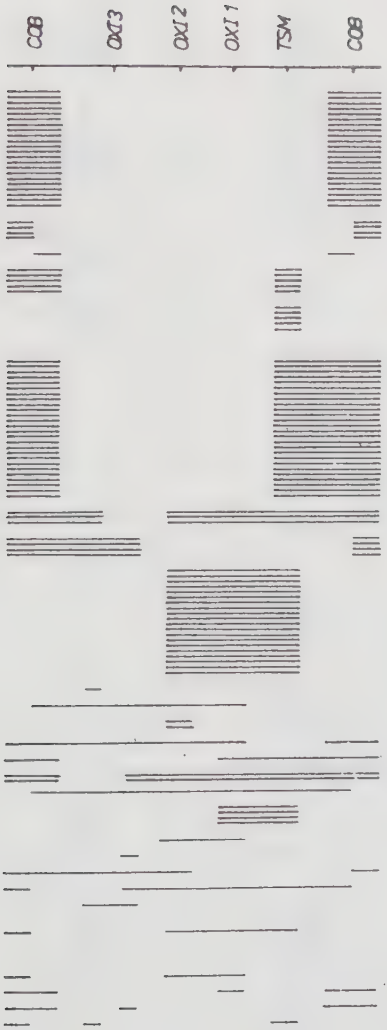


Abb.14
M 12125
36°C
Exp. IX

	KL 14-4A, Exp. I 138 Häufigkeit absol.	relat.	KL 14-4A, Exp. II 120 Häufigkeit absol.	relat.	RM 511-4A, Exp. III 265 Häufigkeit absol.	relat.	RM 590-9D, Exp. IV 426 Häufigkeit absol.	relat.
CAP	39	29% (22-37)	63	53% (44-61)	-	-	296	69% (64-74)
ERY	-	-	-	-	99	37% (31-43)	319	75% (71-79)
M4696	79	58% (49-66)	77	64% (55-73)	153	58% (52-64)	391	92% (89-96)
OLI1	70	51% (43-59)	79	66% (57-74)	-	-	313	73% (68-77)
M4490	65	47% (39-56)	73	61% (52-70)	129	49% (43-55)	305	72% (67-76)
M4752	72	53% (44-61)	79	66% (57-74)	128	48% (42-54)	303	71% (66-75)
M4494	-	-	73	61% (52-70)	-	-	296	69% (64-74)
M1354	73	53% (44-61)	-	-	140	53% (47-59)	-	-
M2011	-	-	77	64% (55-73)	-	-	292	69% (64-74)
M1231	78	57% (48-65)	-	-	141	53% (47-59)	-	-
M5101	-	-	76	63% (54-72)	-	-	288	68% (63-73)
M5020	-	-	76	63% (54-72)	-	-	296	69% (64-74)
M9391	-	-	76	63% (54-72)	-	-	268	63% (58-68)
M9420	-	-	78	65% (56-73)	-	-	289	68% (63-73)
M9410	-	-	78	65% (56-73)	-	-	284	67% (62-72)
OLI2	-	-	-	-	70	26% (21-32)	-	-
M7471	-	-	50	42% (33-51)	-	-	148	35% (30-40)
M1702	-	-	-	-	-	-	120	28% (24-33)
M6701	-	-	-	-	-	-	114	27% (23-32)
M2571	-	-	34	28% (20-37)	-	-	114	27% (23-32)
M6413	-	-	40	33% (25-42)	-	-	113	27% (23-32)
M4191	-	-	-	-	61	23% (17-29)	-	-
M7351	-	-	-	-	51	19% (14-24)	-	-
M7181	47	34% (26-42)	-	-	-	-	-	-
PAR	29	21% (15-29)	47	39% (30-48)	62	23% (17-29)	197	46% (41-51)
M2532	71	52% (44-60)	71	59% (50-68)	104	39% (33-45)	286	67% (62-72)
M4360	-	-	71	59% (50-68)	-	-	244	57% (52-62)
M5631	-	-	66	55% (46-64)	-	-	244	57% (52-62)
M1273	44	32% (24-40)	-	-	82	31% (25-37)	-	-
TSM8	45	33% (25-41)	76	63% (54-72)	86	32% (26-38)	290	68% (63-73)
M5391	-	-	70	58% (49-67)	-	-	294	69% (64-74)
M6681	-	-	-	-	-	-	273	69% (64-74)

Tab. 3: Retentionshäufigkeiten, Exp. I-IV

	CAP	M4696	OLI1	M4490	M4752	M1354	M1231	M7181	PAR	M2532	M1273	TSM8	CAP
CAP		0.65	0.58	0.54	0.60	0.61	0.67	0.95	0.92	0.92	0.77	0.69	-
M4696	4 44		0.30	0.34	0.34	0.54	0.61	1	0.95	1	1	1	0.65
OLI1	4 36	15 6		0.07	0.09	0.39	0.46	1	0.96	1	0.98	0.96	0.58
M4490	5 31	19 5	5 0		0.16	0.40	0.50	1	0.88	1	0.96	0.94	0.54
M4752	5 37	15 8	2 4	2 9		0.45	0.52	0.92	0.98	1	0.97	0.95	0.60
M1354	4 39	21 16	12 15	10 18	15 16		0.16	0.89	0.83	0.91	0.95	0.94	0.61
M1231	5 44	21 20	12 20	11 24	15 21	3 8		0.88	0.89	0.96	1	1	0.67
M7181	24 32	53 22	47 24	43 25	43 21	44 18	47 16		0.58	0.38	0.64	0.79	0.95
PAR	28 19	60 10	53 13	47 11	55 13	51 7	57 8	25 7		0.73	0.72	0.77	0.92
M2532	16 48	41 33	35 36	32 38	36 35	32 30	36 29	1 25	6 44		0.71	0.72	0.92
M1273	20 25	54 19	47 21	43 22	48 20	48 19	53 19	21 18	12 27	31 18		0.37	0.77
TSM8	17 23	55 21	45 21	41 22	46 20	47 19	52 19	25 23	13 29	35 14	9 13		0.69
CAP	-	44 4	36 4	31 5	37 5	39 4	44 5	32 24	19 28	48 16	25 20	23 17	

Tab. 11: Experiment I, KL 14-4A

	ERY	M4696	M4490	M4752	M1354	M1231	OLI2	M4191	M7351	PAR	M2532	M1273	TSM8	ERY
ERY		1,2	1,0	1,0	1,2	1,3	1,6	1,57	1,56	1,56	1,19	0,91	0,68	
M4696	25 82		0,33	0,30	0,64	0,78	1,25	1,27	1,32	1,71	1,78	1,51	1,48	1,2
M4490	29 59	29 1		0,32	0,39	0,50	1,1	1,15	1,22	1,67	1,74	1,58	1,41	1,0
M4752	29 58	26 1	10 19		0,40	0,51	1,09	1,14	1,21	1,67	1,74	1,48	1,40	1,0
M1354	35 76	35 22	12 23	12 24		0,14	1,09	1,11	1,20	1,68	1,78	1,67	1,60	1,2
M1231	37 79	40 28	16 28	16 29	6 7		1,01	1,06	1,15	1,66	1,89	1,71	1,66	1,3
OLI2	73 48	101 18	77 19	76 19	84 14	81 10		0,19	0,39	1,30	1,65	1,59	1,60	1,6
M4191	79 41	107 15	84 16	83 16	89 11	88 8	11 2		0,19	1,27	1,61	1,60	1,62	1,57
M7351	83 33	115 13	92 14	91 14	99 10	97 7	22 3	11 1		1,21	1,57	1,52	1,54	1,56
PAR	79 39	128 37	106 39	105 39	115 37	114 36	47 39	39 41	30 41		1,22	1,31	1,47	1,56
M2532	47 52	106 57	89 64	88 64	101 58	102 66	48 82	41 84	33 86	26 68		0,47	0,78	1,19
M1273	45 27	107 35	88 41	88 41	105 45	107 46	52 63	46 66	36 66	37 53	30 8		0,40	0,91
TSM8	34 21	102 35	83 40	82 40	99 44	102 46	52 68	47 72	37 72	44 65	41 23	13 18		0,68
ERY		82 25	59 29	58 29	76 35	79 37	48 73	41 79	33 83	39 79	52 47	27 45	21 34	

Tab. 13: Experiment III, RM 511-4A

	CAP	M4696	OLI1	M4490	M4752	M4494	M2011	M5101	M5020	M5401	M9391	M9420	M9410	M7471	M2571	M6413	PAR	M2532	M4360	M5631	TSMB	M5391	CAP
CAP		0,49	0,67	0,66	0,81	0,84	0,87	0,91	0,93	0,93	0,89	0,93	0,93	1	1	1	1	0,87	0,77	0,61	0,68	0,43	
M4696	7 21		0,29	0,62	0,44	0,48	0,56	0,62	0,62	0,62	0,62	0,66	0,66	0,84	1	1	1	1	1	0,9	0,84	0,71	0,49
OLI1	11 27	6 9		0,15	0,19	0,30	0,35	0,4	0,4	0,4	0,59	0,60	0,60	0,81	0,99	1	1	1	1	1	0,93	0,86	0,67
M4490	14 24	9 5	7 1		0,22	0,36	0,37	0,42	0,42	0,49	0,53	0,57	0,57	0,75	0,93	1	0,95	0,7	1	0,93	0,77	0,77	0,66
M4752	15 31	10 13	5 5	3 9		0,37	0,38	0,4	0,4	0,43	0,51	0,55	0,55	0,77	0,95	0,98	1	0,99	1	0,98	0,81	0,86	0,81
M4494	19 29	15 11	11 5	10 10	13 7		0,07	0,17	0,17	0,17	0,38	0,42	0,42	0,92	0,9	0,98	1	1	1	1	0,97	0,98	0,84
M2011	18 32	15 15	10 8	8 12	11 9	0 4		0,04	0,04	0,13	0,43	0,43	0,43	0,74	0,94	1	0,37	1	1	1	0,99	0,99	0,87
M5101	19 33	17 16	12 9	10 13	12 9	3 6	0 2		0	0,07	0,45	0,49	0,49	0,76	0,96	0,98	1	1	1	1	1	0,97	0,91
M5020	20 33	17 16	12 9	10 13	12 9	3 6	3 2	0 0		0,07	0,45	0,49	0,49	0,76	0,96	0,98	1	1	1	1	1	0,97	0,93
M5401	20 33	17 16	12 9	12 15	13 10	3 6	4 3	2 2	2 2		0,48	0,45	0,45	0,79	0,96	0,98	0,47	1	1	1	1	1	0,93
M9391	19 32	17 16	17 14	13 16	15 12	9 12	12 11	12 12	12 12	13 13		0	0,03	0,7	0,9	0,92	0,88	1	1	0,99	0,78	0,97	0,89
M9420	19 34	17 18	16 15	13 18	15 14	9 14	11 12	12 14	12 14	11 13	0 2		0,03	0,72	0,91	0,94	1	0,78	1	1	0,52	0,98	0,93
M9410	19 34	17 18	16 15	13 18	15 14	9 14	11 12	12 14	12 14	11 13	0 2	0 0		0,72	0,91	0,94	1	1	1	1	0,82	0,98	0,93
M7471	39 26	39 12	39 10	34 11	38 9	33 10	36 9	36 10	36 10	37 11	34 8	36 8	36 8		0,52	0,58	0,84	0,95	1	1	1	1	1
M2571	47 18	54 11	55 10	49 10	54 9	48 9	52 9	52 10	52 10	52 10	50 8	52 8	52 8	22 6		0,2	0,70	0,91	0,97	0,96	0,99	1	1
M6413	46 23	53 16	53 14	47 15	51 12	47 14	51 14	49 13	49 13	49 13	47 11	49 11	49 11	21 11	2 8		0,61	0,86	0,93	0,9	0,92	1	1
PAR	40 24	47 18	48 16	42 16	49 17	46 20	11 12	46 17	46 17	10 19	37 17	48 17	48 17	25 22	12 25	13 20		0,61	0,8	0,76	0,96	0,96	1
M2532	21 29	32 26	33 25	28 26	31 23	32 30	33 27	34 29	34 29	34 30	32 27	34 27	17 26	18 39	10 47	11 42	7 30		0,25	0,33	0,65	0,69	0,87
M4360	18 26	31 25	34 26	29 27	32 24	33 31	34 28	35 30	35 30	36 31	32 28	35 28	35 28	21 42	12 49	13 44	12 36	7 7		0,12	0,49	0,55	0,77
M5631	17 20	31 20	35 22	30 23	34 21	34 27	36 25	36 26	36 26	38 28	33 23	34 23	34 23	22 38	13 45	14 40	13 32	12 7	6 1		0,27	0,47	0,61
TSMB	13 26	23 22	26 23	20 22	23 20	25 28	24 26	27 27	27 27	28 27	21 21	23 21	23 21	19 44	11 53	11 47	15 44	16 20	11 16	6 9		0,43	0,68
																							0,43

	CAP	ERY	M4696	OLII	M4490	M4752	M4494	M2011	M5101	M5020	M5401	M5391	M9420	M9410	M7471	M1702	M5701	M2571	M5413	PAR	M2532	M4360	M5631	TSM8	M5391	M6681	CAP
CAP		0,08	0,51	0,44	0,43	0,44	0,49	0,53	0,52	0,53	0,50	0,52	0,52	0,54	0,71	0,75	0,74	0,73	0,73	0,70	0,50	0,37	0,38	0,32	0,27	0,25	
ERY	1 20		0,47	0,44	0,45	0,44	0,51	0,55	0,55	0,56	0,53	0,55	0,56	0,57	0,72	0,76	0,75	0,75	0,75	0,71	0,52	0,41	0,41	0,35	0,28	0,27	0,08
M4696	20 110	21 92		0,31	0,31	0,32	0,44	0,49	0,50	0,49	0,46	0,48	0,45	0,50	0,69	0,72	0,72	0,72	0,72	0,73	0,66	0,64	0,64	0,62	0,60	0,60	0,51
OLII	50 70	58 60	72 3		0,04	0,04	0,22	0,27	0,28	0,28	0,25	0,27	0,28	0,29	0,57	0,66	0,66	0,66	0,67	0,68	0,64	0,61	0,62	0,58	0,57	0,56	0,44
M4490	67 52	62 58	76 1	9 3		0,04	0,25	0,28	0,28	0,28	0,25	0,27	0,28	0,30	0,58	0,66	0,65	0,66	0,66	0,70	0,62	0,60	0,60	0,59	0,57	0,56	0,43
M4752	54 66	63 56	79 1	10 1	7 4		0,22	0,26	0,26	0,27	0,23	0,26	0,27	0,28	0,57	0,65	0,64	0,65	0,65	0,70	0,63	0,61	0,61	0,59	0,57	0,56	0,44
M4494	66 70	76 62	99 14	38 22	39 29	34 27		0,07	0,09	0,1	0,06	0,13	0,11	0,13	0,52	0,60	0,60	0,61	0,56	0,67	0,58	0,59	0,58	0,58	0,63	0,62	0,49
M2011	74 73	85 65	109 18	48 26	47 31	41 30	12 6		0,03	0,04	0,05	0,09	0,05	0,07	0,49	0,58	0,58	0,59	0,60	0,67	0,59	0,62	0,62	0,62	0,67	0,65	0,53
M5101	74 71	86 64	111 18	50 26	48 30	44 29	16 8	4 3		0,02	0,06	0,09	0,06	0,07	0,49	0,58	0,58	0,59	0,60	0,68	0,60	0,63	0,63	0,62	0,67	0,66	0,52
M5020	72 74	84 67	107 19	47 28	45 32	42 32	15 12	3 7	0 5		0,08	0,10	0,06	0,07	0,50	0,59	0,57	0,59	0,61	0,69	0,61	0,64	0,64	0,63	0,68	0,67	0,53
M5401	72 67	84 60	108 13	47 21	44 24	41 24	13 3	9 5	10 8	14 7		0,09	0,07	0,09	0,50	0,59	0,59	0,60	0,61	0,66	0,58	0,59	0,58	0,59	0,63	0,62	0,50
M5391	83 64	95 58	120 11	58 18	55 21	52 21	30 6	22 4	20 4	24 3	20 6		0,05	0,05	0,48	0,58	0,57	0,59	0,61	0,68	0,61	0,63	0,63	0,63	0,66	0,65	0,52
M9420	74 71	87 65	101 15	51 27	48 30	45 30	19 11	9 6	8 8	11 6	9 11	0 15		0,02	0,50	0,59	0,57	0,59	0,61	0,68	0,60	0,63	0,62	0,64	0,61	0,66	0,52
M9410	78 72	91 65	114 18	54 27	54 30	48 30	23 12	13 7	11 8	14 6	13 12	0 13	5 1		0,49	0,58	0,57	0,59	0,61	0,70	0,62	0,65	0,64	0,66	0,62	0,67	0,54
M7471	176 45	191 41	233 12	163 18	164 18	161 18	148 12	141 11	139 11	144 11	140 14	127 15	140 12	137 12		0,15	0,18	0,20	0,21	0,55	0,70	0,77	0,77	0,77	0,80	0,79	0,71
M1702	197 41	213 38	258 12	196 19	191 20	188 20	176 15	169 14	167 14	172 14	168 17	155 18	168 15	165 15	89 4		0,07	0,08	0,08	0,51	0,70	0,78	0,78	0,78	0,81	0,80	0,75
M5701	198 37	215 35	262 11	199 17	193 17	190 17	178 12	171 11	169 11	174 11	170 14	157 15	169 11	166 11	35 5	10 5		0,05	0,07	0,50	0,69	0,77	0,77	0,78	0,80	0,80	0,74
M2571	197 36	214 34	261 10	200 18	194 18	191 18	180 14	173 13	171 13	176 13	172 16	159 17	172 14	169 14	37 7	11 6	5 5		0,03	0,47	0,68	0,75	0,75	0,76	0,78	0,78	0,73
M5413	198 35	216 34	264 8	202 18	196 18	193 18	165 13	176 14	174 14	179 14	175 17	163 19	176 16	173 16	39 7	12 5	8 6	4 2		0,46	0,68	0,75	0,76	0,76	0,79	0,78	0,73
PAR	146 62	160 56	204 30	153 53	155 56	153 57	144 55	142 59	141 60	146 60	138 59	132 67	142 61	142 64	49 96	29 101	25 102	21 98	19 98		0,48	0,56	0,56	0,64	0,67	0,67	0,70
M2532	71 67	83 60	133 39	101 76	96 77	96 80	85 76	84 82	84 84	88 83	81 82	79 94	85 84	86 88	43 170	33 185	29 186	27 184	27 186	25 117		0,22	0,22	0,33	0,40	0,40	0,50
M4360	75 33	89 28	138 26	120 57	115 58	115 61	108 61	110 69	110 71	114 70	103 66	102 80	110 72	111 76	65 154	54 168	49 170	47 166	47 168	59 101	51 13		0,02	0,18	0,24	0,22	0,37
M5631	76 33	90 28	139 26	121 57	116 58	116 61	108 60	110 68	110 70	114 69	103 65	102 78	110 70	111 74	66 154	55 169	50 170	48 166	48 168	60 101	51 12	3 2		0,18	0,25	0,24	0,38
TSM8	45 44	58 37	126 34	91 68	89 72	88 74	84 77	86 85	85 87	89 85	80 83	80 99	88 91	89 95	54 183	45 199	42 201	39 198	39 200	54 135	45 47	5 46	5 46		0,12	0,14	0,32
M5391	36 38	47 30	121 33	88 69	85 72	84 74	89 85	91 94	91 95	94 93	84 92	83 10	81 88	82 92	57 190	48 206	45 208	42 205	42 207	57 207	53 143	13 59	13 58	15 19		0,05	0,27
M6681	34 35	46 28	122 33	87 67	84 70	83 72	88 84	90 92	90 94	93 92	83 90	82 102	89 94	90 98	56 187	48 205	45 207	42 204	42 206	58 143	54 59	11 53	12 56	19 20	8 7		0,25
CAP		20 1	110 20	70 50	67 52	66 54	70 66	73 74	71 74	74 72	67 72	64 83	71 74	72 78	45 176	41 197	37 198	36 197	35 198	62 146	67 71	33 75	33 76	44 45	38 36	35 34		

Tab. 14: Exp. IV, RM 590-9D

LITERATURVERZEICHNIS

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Alwine, J.C., Kemp, D.J., Stark, G.R.: Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloximethyl-paper and hybridization with DNA probes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5350-5354 (1977)

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., deBruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R. and Young, I.G.: Sequence and Organization of the human mitochondrial genome.
Nature 290, 457-465 (1981)

Anziano, P.Q., Hanson, D.K., Mahler, H.R., Perlman, P.S.: Functional domains in introns, trans-acting and cis-acting regions of intron 4 of the cob gene.
Cell 30, 925-932 (1982)

Asenbeck, M.: Lokalisierung einiger Mutanten ausserhalb der bekannten Genregionen der mitochondrialen DNA.
Diplomarbeit, München (1980)

Attardi, G., Cantatore, P., Chomyn, A., Crews, S., Gelfand, R., Merkel, C., Montoya, J. and Ojala, D.: A comprehensive view of mitochondrial gene expression in human cells.
In: Mitochondrial Genes (Slonimski, P., Borst, P. and Attardi, G., eds.) Cold Spring Harbor Laboratories, 51-72 (1982)

Avner, P.R., Coen, D., Dujon, B. and Slonimski, P.P.: Mitochondrial genetics. IV. Allelism and mapping studies of oligomycin-resistant mutants in Saccharomyces cerevisiae.
Mol. Gen. Genet. 125, 9-52 (1973)

Backhaus, B., Schweyen, R.J., Kaudewitz, F. and Dujon, B.: On the formation of rho⁻ petites in yeast. III. Effects of temperature on transmission and recombination of mitochondrial markers and on rho⁻ cell formation in temperature-sensitive mutants of Saccharomyces cerevisiae.
Mol. Gen. Genet. 161, 153-173 (1978)

Baldacci, G., de Zamaroczy, M. and Bernardi, G.: Excision sites in the clusters of the mitochondrial genome of yeast.
FEBS Lett. 114, 234-236 (1980)

Baldacci, G., Bernardi, G.: Replication origins are associated with transcription initiation sequences in the mitochondrial genome of yeast.
EMBO J. 1, 987-994 (1982)

Bandlow, W. and Schweyen, R.J.: On the mechanism of petite genesis in yeast. IV. Biochemical characterization of a conditional cytoplasmic mutant producing petites at restrictive temperature.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 1078-1085 (1975)

Bechmann, H., Haid, A., Schweyen, R.J., Mathews, S., Kaudewitz, F.: Expression of the 'split gene' COB in yeast mtDNA. Translation of intervening sequences in mutant strains.
J. Biol. Chem. 256, 3525-3531 (1981)

Bernardi, G., Faurès, M., Piperno, G., Slonimski, P.P.: Mitochondrial DNAs from respiratory-sufficient and cytoplasmic respiratory-deficient mutant yeast.
J. Mol. Biol. 48, 23-42 (1970)

Bernardi, G.: The petite mutation in yeast.
Trends Biochem. Sci. 4, 197-201 (1979)

Bernardi, G., Baldacci, G., Faugeron-Fonty, G., Gaillard, C., Goursot, R., Huyard, A., Mangin, M., Marotta, R. and de Zamaroczy, M.: The petite mutation: excision sequences, replication origins and suppressivity.
In: The Organization and the Expression of the Mitochondrial Genome (Saccone, C. and Kroon, A.M., eds.) Elsevier/North Holland, Amsterdam, 21-33 (1980)

Bernardi, G.: The origins of replication of the mitochondrial genome in yeast.
Trends Biochem. Sci. 7, 404-408 (1982)

Blanc, H. and Dujon, B.: Replicator regions of the yeast mitochondrial DNA responsible for suppressiveness.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3942-3946 (1980)

Blanc, H. and Dujon, B.: Replicator regions of the yeast mitochondrial DNA active in vivo and in yeast transformants.
In: Mitochondrial Genes (Slonimski, P., Borst, P. and Attardi, G., eds.) Cold Spring Harbor Laboratories, 279-294 (1982)

Böker, E., Kaudewitz, F., Richmond, K.V., Schweyen, R.J., Thomas, D.Y.: The effect of glucose on the number of mitochondrial genomes participating in mitochondrial crosses.
In: Genetics, Biogenesis and Bioenergetics of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Thomas, D.Y., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.) de Gruyter/Berlin, 99-115 (1976)

Bolotin, M., Coen, D., Deutsch, J., Dujon, B., Netter, P., Petrochilo, E. and Slonimski, P.P.: La récombinaison des mitochondries chez Saccharomyces cerevisiae.
Bull. Inst. Pasteur 69, 215-239 (1971)

Bonitz, S.G., Coruzzi, G., Thalenfeld, B.E., Tzagoloff, A. and Macino, G.: Assembly of the mitochondrial membrane system: physical map of the OXI3 locus of yeast mitochondrial DNA.
J. Biol. Chem. 255, 11922-11926 (1980a)

Bonitz, S.G., Coruzzi, G., Thalenfeld, B.E., Tzagoloff, A. and Macino, G.: Assembly of the mitochondrial membrane system: structure and nucleotide sequence of the gene coding for subunit I of yeast cytochrome oxidase.
J. Biol. Chem. 255, 11927-11941 (1980b)

Borst, P., Bos, J.L., Grivell, L.A., Groot, G.S.P., Heyting, C., Moorman, A.F.M., Sanders, J.P.M., Talen, J.L., van Kreijl, C.F. and van Ommen, G.J.B.: The physical map of yeast mitochondrial DNA: anno 1977
In: Mitochondria 1977: genetics and biogenesis of mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.) de Gruyter/Berlin, 213-254 (1977)

Burger, G., Lang, B., Bandlow, W., Schweyen, R.J., Backhaus, B. and Kaudewitz, F.: Antimycin resistance in Saccharomyces cerevisiae: a new mutation on the mtDNA conferring antimycin resistance on the mitochondrial respiratory chain.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 1201-1208 (1976)

Butow, R.A., Farrelly, F., Zassenhaus, H.P., Hudspeth, M.E.S., Grossmann, L.I., Perlman, P.S.: varl determinant region of yeast mitochondrial DNA.
In: Mitochondrial Genes (Slonimski, P., Borst, P. and Attardi, G., eds.) Cold Spring Harbor Laboratories, 241-254 (1982)

Carignani, G., Dujardin, G. and Slonimski, P.P.: Petite deletion map of the mitochondrial OXI3 region in Saccharomyces cerevisiae.
Mol. Gen. Genet. 167, 301-308 (1979)

Carnevali, F., Morpurgo, G. and Tecce, G.: Cytoplasmic DNA from petite colonies of Saccharomyces cerevisiae. A hypothesis on the nature of the mutation.
Science 163, 301-308 (1969)

Chambon, P.: Split genes.
Scient. Amer. 244, 48-59 (1981)

Claisse, M.L., Spyridakis, A., Wambier-Kluppel, M.L., Pajot, P., Slonimski, P.P.: Mosaic organization and expression of the mitochondrial DNA region controlling cytochrome c reductase and oxidase. II. Analysis of proteins translated from the box region.
In: Biochemistry and genetics of yeasts. Pure and applied aspects. (Bacila, M., Horecker, B.L., Stoppani, A.O.H., eds.) Academic Press/ New York, 369-390 (1978)

Clark-Walker, G.D., McArthur, C.R., Daley, D.J.: Does mitochondrial DNA length influence the frequency of spontaneous petite mutants in yeasts?
Curr. Genet. 4, 7-12 (1981)

Colson, A.M. and Slonimski, P.P.: Resistance to high concentrations of antimycin A in Saccharomyces cerevisiae: synergistic interaction of nuclear and mitochondrial mutations.
In: Mitochondria 1977: genetics and biogenesis of mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.) de Gruyter/Berlin, 185-198 (1977)

Cryer, D.R., Eccleshall, R., Marmur, J.: Isolation of yeast DNA.
In: Methods in Cell Biology, Vol. XII: Yeast Cells (Prescott, D.M., ed.) Academic Press/New York, 39-44 (1975)

de la Salle, H., Jacq, C., Slonimski, P.P.: Critical sequences within mitochondrial introns: pleiotropic mRNA maturase and cis-dominant signals of the box intron controlling reductase and oxidase.
Cell 28, 721-732 (1982)

Deutsch, J., Dujon, B., Netter, P., Petrochilo, E., Slonimski, P.P., Bolotin-Fukuhara, M., Coen, D.: Mitochondrial genetics. VI. The petite mutation in Saccharomyces cerevisiae: interrelations between the loss of the rho+ factor and the loss of the drug resistance mitochondrial genetic markers.
Genetics 76, 195-219 (1974)

de Zamaroczy, M., Marotta, R., Faugeron-Fonty, G., Goursot, R., Mangin, M., Baldacci, G., Bernardi, G.: The origins of replication of the yeast mitochondrial genome and the phenomenon of suppressivity.
Nature 292, 75-78 (1981)

de Zamaroczy, M., Faugeron-Fonty, G., Bernardi, G.:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, in press (1982)

Dieckmann, C.L., Pape, L.K., Tzagoloff, A.: Identification and cloning of a yeast nuclear gene (CBP1) involved in expression of mitochondrial cytochrome b.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1805-1809 (1982)

Dougals, M.G., Strausberg, R.L., Perlman, P.S., Butow, R.A.: Genetic analysis of mitochondrial polymorphic proteins in yeast.
In: Genetics and biogenesis of chloroplasts and mitochondria (Bücher, T., Neupert, W., Sebald, W., Werner, S., eds.) Elsevier/North Holland, Amsterdam, 435-442 (1976)

Dujon, B.: Sequence of the intron and flanking exons of the mitochondrial 21S rRNA gene of yeast strains having different alleles at the omega and RIB1 loci.
Cell 20, 185-197 (1980a)

Dujon, B., Blanc, H.: Yeast mitochondria mini-lysates and their use to screen a collection of hypersuppressive rho$^-$-mutants.
In: The organization and expression of the mitochondrial genome (Saccone, C., Kroon, A.M., eds.) Elsevier/North Holland, Amsterdam, 33-36 (1980b)

Dujon, B.: Mitochondrial genetics and functions.
In: The molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Life and inheritance. (Strathern, J., Jones, E.W., Broach, J. R., eds.) Cold Spring Harbor Laboratories, 505-635 (1981)

Ephrussi, B., Hottinguer, H., Chímenes, Y.: Action de l'acriflavine sur les lévures. I. La mutation 'petite colonie'.
Ann. Inst. Pasteur 76, 351-364 (1949)

Ephrussi, B., Hottinguer, H.: Direct demonstration of the mutagenic action of euflavin on baker's yeast.
Nature 166, 956 (1950)

Ephrussi, B. and Slonimski, P.P.: Yeast mitochondria: subcellular units involved in the synthesis of respiratory enzymes in yeast.
Nature 176, 1207-1208 (1955)

Ephrussi, B., Grandchamp, C.: Etudes sur la suppressivité des mutants à déficience respiratoire de la lévure.I. Existence au niveau cellulaire de divers degrés de suppressivité.
Heredity 20, 1-7 (1965)

Faye, G., Fukuhara, H., Grandchamp, C., Lazowska, J., Michel, F., Casey, J., Stetz, G.S., Locker, J., Rabinowitz, M., Bolotin-Fukuhara, M., Coen, D., Deutsch, J., Dujon, B., Netter, P., Slonimski, P.P.: Mitochondrial nucleic acids in the petite colony mutants: deletions and repetitions of genes.
Biochimie 55, 779-792 (1973)

Foury, F.: Endonucleases in yeast mitochondria. Apurinic and manganese-stimulated deoxyribonuclease activitites in the inner mitochondrial membrane of Saccharomyces cerevisiae.
Eur. J. Biochem. 124, 253-259 (1982)

Fukuhara, H., Wesolowski, M.: Preferential loss of a specific region of mitochondrial DNA by rho$^-$ mutation .
In: Mitochondria 1977: Genetics and biogenesis of mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.) de Gruyter/Berlin, 123-131 (1977)

Gaillard, C., Bernardi, G.: The nucleotide sequence of the mitochondrial genome of a spontaneous 'petite' mutant of yeast.
Mol. Gen. Genet. 174, 335-337 (1979)

Gaillard, C., Strauss, F., Bernardi, G.: Excision sequences in the mitochondrial genome of yeast.
Nature 283, 218-220 (1980)

Goursot, R., Mangin, M., Bernardi, G.: Surrogate origins of replication in the mitochondrial genomes of ori^0 petite mutants of yeast.
EMBO J. 1, 705-711 (1982)

Grivell, L.A., Moorman, A.F.M.: A structural analysis of the OXI3-region on yeast mtDNA.
In: Mitochondria 1977: genetics and biogenesis of mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.) de Gruyter/Berlin, 371-384 (1977)

Grivell, L.A.: Mitochondrial DNA.
Scient. Amer. 248, 60-73 (1983)

Grosch, G., Schmelzer, C., Mathews, S.: Physical map of the COB-region in mitochondrial DNA of Saccharomyces cerevisiae.
Curr. Genet. 3, 65-71 (1981)

Haid, A., Schweyen, R.J., Bechmann, H., Kaudewitz, F., Solioz, M., Schatz, G.: The mitochondrial cob-region in yeast codes for apocytochrome b and is mosaic.
Eur. J. Biochem. 94, 451-464 (1979)

Handwerker, A., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F.: Evidence for a extrakaryotic mutation affecting the maintenance of the rho factor in yeast.
J. Bacteriol. 113, 1307-1310 (1973)

Hensgens, L.A.M., Grivell, L.A., Borst, P., Bos, J.L.: Nucleotide sequence of the mitochondrial structural gene for subunit 9 of yeast ATPase complex.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1663-1667 (1979)

Hensgens, L.A.m., Arnberg, A.C., Roosendaal, E., van der Horst, G., van der Vreen, R., van Ommen, G.J.B., Grivell, L.A.: Variation, transcription and circular RNAs of the mitochondrial gene for subunit I of cytochrome c oxidase.
J. Mol. Biol. 164, 35-58 (1983a)

Hensgens, L.A.M., Bonen, L., de Haan, M., van der Horst, G., Grivell, L.A.: Two intron sequences in yeast mitochondrial COX1 gene: homology among urf-containing introns and strain-dependent variation in flanking exons.
Cell 32, 379-389 (1983b)

Heyting, C., Meijlink, F.C.P.W., Verbeet, M.P., Sanders, J.P.M., Bos, J.L., Borst, P.: Fine structure of the 21S ribosomal RNA region in yeast mitochondrial DNA. I. Construction of the physical map and localization of the cistron for the 21S mitochondrial ribosomal RNA.
Mol. Gen. Genet. 168, 231-250 (1979a)

Heyting, C., Menke, H.H.: Fine structure of the 21S ribosomal RNA region in yeast mitochondrial DNA. III. Physical location of mitochondrial genetic markers and the molecular nature of omega.
Mol. Gen. Genet. 168, 279-291 (1979b)

Holzer, H.: Catabolite inactivation in yeast.
Trends Biochem. Sci. 1, 178-180 (1976)

Hudspeth, M.E.S., Ainley, W.M., Shennard, D.S., Butow, R.A., Grossmann, L.I.: Localization and structure of the var1 gene on yeast mitochondrial DNA.
Cell 30, 617-626 (1982)

Jacq, C., Lazowska, J., Slonimski, P.P.: Sur un nouveau méchanisme de la régulation de l'expression génétique.
Comp. Rend. Acad. Sci. Paris 290, 89-92 (1980)

Jacq, C., Pajot, P., Lazowska, J., Dujardin, G., Claisse, M., Groudinsky, O., de la Salle, H., Grandchamp, C., Labouesse, M., Gargouri, A., Guiard, B., Spyridakis, A., Dreyfus, M., Slonimski, P.P.: Role of introns in the yeast cytochrome b gene: cis- and trans-acting signals, intron manipulation, expression and intergenic communications.
In: Mitochondrial genes (Slonimski, P., Borst, P., Attardi, G., eds.) Cold Spring Harbor Laboratories, 155-183 (1982)

Kotylak, Z., Slonimski, P.P.: Joint control of cytochrome a and b by a unique mitochondrial DNA region comprising four genetic loci.
In: The genetic functions of mitochondrial DNA (Saccone, C., Kroon, A.M., eds.) Elsevier/North Holland, Amsterdam, 143-154 (1976)

Kotylak, Z., Slonimski, P.P.: Fine structure genetic map of the mitochondrial DNA region controlling coenzyme QH_2-cytochrome c reductase.
In: Mitochondria 1977: genetics and biogenesis of mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.) de Gruyter/Berlin, 161-172 (1977a)

Kotylak, Z., Slonimski, P.P.: Mitochondrial mutants isolated by a new screening method based upon the use of the nuclear mutation op1.
In: Mitochondria 1977: genetics and biogenesis of mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.) de Gruyter/Berlin, 83-89 (1977b)

Kovačova, V., Irmlerova, J., Kovač, L.: Oxidative phosphorylation in yeast. IV. Combination of a nuclear mutation affecting oxidative phosphorylation with cytoplasmic mutation to respiratory deficiency.
Biochim. Biophys. Acta 162, 157-163 (1968)

Kutzleb, R., Schweyen, R.J., Kaudewitz, F.: Extrachromosomal inheritance of paromomycin resistance in Saccharomyces cerevisiae.
Mol. Gen. Genet. 125, 91-98 (1973)

Lang, B., Burger, G., Doxiadis, I., Thomas, D.Y., Bandlow, W., Kaudewitz, F.: A simple method for the large-scale preparation of mitochondria from microorganisms.
Anal. Biochem. 77, 110-121 (1977)

Lamouroux, A., Pajot, P., Kochko, A., Halbreich, A., Slonimski, P.P.: Cytochrome b mRNA maturase encoded in an intron regulates the expression of the split gene. II. Trans- and cis-acting mechanisms of mRNA splicing.
In: The organization and expression of the mitochondrial genome (Saccone, C., Kroon, A.M., eds.) Elsevier/North Holland, Amsterdam, 153-156 (1980)

Lazowska, J., Michel, F., Faye, G., Fukuhara, H., Slonimski, P.P:: Physical and genetic organization of petite and grande yeast mitochondrial DNA. II. DNA-DNA hybridization studies and buoyant densities determinations.
J. Mol. Biol. 256, 393-410 (1974)

Lazowska, J., Jacq, C., Slonimski, P.P.: Sequence of introns and flanking exons in the wild-type and box3 mutants of the mitochondrial cytochrome b gene reveals an interlaced splicing protein coded by an intron.
Cell 22, 333-348 (1980)

Levens, D., Lustig, A., Rabinowitz, M.: Purification of mitochondrial RNA polymerase from Saccharomyces cerevisiae.
J. Biol. Chem. 256, 1474-1481 (1981)

Lewin, A., Morimoto, R., Rabinowitz, M., Fukuhara, H.: Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNAs of petite mutants of yeast: classification of petites and deletion mapping of mitochondrial genes.
Mol. Gen. Genet. 163, 257-275 (1978)

Locker, J.: Analytical and preparative electrophoresis of RNA in urea gels.
Anal. Biochem. 98, 358-367 (1979)

Macino, G., Tzagoloff, A.: Assembly of mitochondrial membrane system: partial sequence of a mitochondrial ATPase gene in Saccharomyces cerevisiae.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 131-135 (1979)

Macino, G., Tzagoloff, A.: Assembly of the mitochondrial membrane system: sequence analysis of the yeast mitochondrial ATPase gene containing the OLI2 and OLI4 loci.
Cell 20, 507-517 (1980)

Mahler, H.R., Perlman, P.S.: Induction of respiration-deficient mutants in Saccharomyces cerevisiae by berenil. I. Berenil, a novel non-intercalating mutagen.
Mol. Gen. Genet. 121, 285-294 (1973)

Mahler, H.R., Bastos, R.N.: A novel reaction of mitochondrial DNA with ethidium bromide.
FEBS Lett. 39, 27-34 (1974)

Marotta, R., Colin, Y., Goursot, R., Bernardi, G.: A region of extreme instability in the mitochondrial genome of yeast.
EMBO J. 5, 529-534 (1982)

McDonnell, M.W., Simon, M.N., Studier, F.W.: Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels.
J. Mol. Biol. 110, 119-146 (1977)

Michaelis, G.: Cytoplasmic inheritance of antimycin A resistance in Saccharomyces cerevisiae.
Mol. Gen. Genet. 146, 130-137 (1976)

Michel, F., Grandchamp, C., Dujon, B.: Genetic and physical characterization of a segment of yeast mitochondrial DNA involved in the control of genetic recombination.
Biochimie 61, 985-1010 (1979)

Molloy, P.L. Linnane, A.W., Lukins, H.B.: Biogenesis of mitochondria: analysis of deletion of mitochondrial antibiotic resistance markers in petite mutants of Saccharomyces cerevisiae.
J. Bacteriol. 122, 7-18 (1975)

Morimoto, R., Lewin, A., Hsu, H.J., Rabinowitz, M., Fukuhara, H.: Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from grande and genetically characterized cytoplasmic petite clones of Saccharomyces cerevisiae.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3868-3872 (1975)

Morimoto, R., Lewin, A., Merten, S., Rabinowitz, M.: Restriction endonuclease mapping and analysis of grande and mutant yeast mitochondrial DNA.
In: Genetics and biogenesis of chloroplasts and mitochondria (Bücher, T., Neupert, W., Sebald, W., Werner, S., eds.) Elsevier/North Holland, Amsterdam, 519-525 (1976)

Morimoto, R., Lewin, A., Rabinowitz, M.: Physical mapping and characterization of the mitochondrial DNA and RNA sequences from mit$^-$ mutants defective in cytochrome oxidase peptide 1 (OXI3).
Mol. Gen. Genet. 170, 1-9 (1979a)

Morimoto, R., Rabinowitz, M.: Physical mapping of the XbaI, HincII, BglII, XhoI, SstI and PvuII restriction endonuclease cleavage fragments of mitochondrial DNA of Saccharomyces cerevisiae.
Mol. Gen. Genet. 170, 11-23 (1979b)

Morimoto, R., Rabinowitz, M.: Physical mapping of the yeast mitochondrial genome: derivation of the fine structure and gene map of strain D 273-10B and comparison with a strain (MH 41-7B) differing in genome size.
Mol. Gen. Genet. 170, 25-48 (1979c)

Moustacchi, E.: Evidence for nucleus independent steps in control of repair of mitochondrial damage. I. UV-induction of the cytoplasmic 'petite' mutation in UV-sensitive nuclear mutants of Saccharomyces cerevisiae.
Mol. Gen. Genet. 114, 50-58 (1971)

Müller, W., Gautier, F.: Interaction of heterochromatic compounds with nucleic acids. AT-specific non-intercalating DNA ligands.
Eur. J. Biochem. 54, 385-394 (1975)

Nagai, S. & H.: Demonstration of the induction of respiration-deficient yeast by manganese using a selective culture medium.
Naturwissenschaften 45, 441-442 (1958)

Nagai, S., Yanagishima, N., Nagai, H.: Advances in the study of the respiration-deficient (RD) mutation in yeast and other microorganisms.
Bacteriol. Rev. 25, 404-426 (1961)

Netter, P., Petrochilo, E., Slonimski, P.P., Bolotin-Fukuhara, M., Coen, D., Deutsch, J., Dujon, B.: Mitochondrial genetics. VII. Allelism and mapping studies of ribosomal mutants resistant to chloramphenicol, erythromycin and spiramycin in Saccharomyces cerevisiae.
Genetics 78, 1063-1100 (1974)

Netter, P., Jacq, C., Carignani, G., Slonimski, P.P.: Critical sequences within mitochondrial introns: cis-dominant mutations of the 'cytochrome-like' intron of the oxidase gene.
Cell 28, 733-738 (1982)

Nobrega, F.G., Tzagoloff, A.: Assembly of the mitochondrial membrane system. DNA sequence and organization of the cytochrome b gene in Saccharomyces cerevisiae D 273-10B.
J. Biol. Chem. 255, 9828-9837 (1980a)

Nobrega, F.G., Tzagoloff, A.: Assembly of the mitochondrial membrane system. Structure and location of the mitochondrial glutamic tRNA gene in Saccharomyces cerevisiae.
FEBS Lett. 113, 52-57 (1980b)

Noll, H., Stutz, E.: The use of sodium and lithium dodecyl sulfate in nucleic acid isolation.
In: Methods of Enzymology. Vol. XII (Grossman, L., Moldave, K., eds.) Academic Press/New York, 129-155 (1968)

Oakley, K.M., Clark-Walker, G.D.: Abnormal mitochondrial genomes in yeast restored to respiratory-competence.
Genetics 90, 517-530 (1978)

Perlman, P.S., Birkey, C.W.: Mitochondrial genetics in baker's yeast: a molecular mechanism for recombinational polarity and suppressiveness.
Proc. Natl. Sci. USA 71, 4612-4616 (1974)

Perlman, P.S., Alexander, N.J., Mahler, H.R., Hanson, D.K.: Mosaic genes in yeast mitochondria.
In: Gene structure and expression (Dean, D.H., Johnson, L.F., Kimball, P.K., Perlman, P.S., eds.) Ohio State University Press/ Columbus, 211 (1980)

Prunell, A., Bernardi, G.: The mitochondrial genome of wild-type yeast cells. IV. Genes and spacers.
J. Mol. Biol. 86, 825-841 (1974)

Putrament, A., Baranowska, H., Prazmo, W.: Induction by manganese of mitochondrial antibiotic resistance mutations in yeast.
Mol. Gen. Genet. 126, 357-366 (1973)

Putrament, A., Baranowska, H., Ejchart, A., Prazmo, W.: Manganese mutagenesis in yeast. III. A practical application of manganese for the induction of mitochondrial antibiotic resistant mutations.
J. Gen. Microbiol. 62, 265-266 (1975)

Rank, G.H.: Genetic evidence for 'Darwinian' selection at the molecular level. I. The effect of the suppressive factor on cytoplasmically inherited erythromycin resistance in Saccharomyces cerevisiae.
Can. J. Genet. Cytol. 12, 129-136 (1970a)

Rank, G.H.: Genetic evidence for 'Darwinian' selection at the molecular level. II. Genetic analysis of cytoplasmically - inherited high and low suppressivity in Saccharomyces cerevisiae.
Can. J. Genet. Cytol. 12, 340-346 (1970b)

Rigby, P.W., Dieckmann, M., Rhodes, C., Berg, P.: Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I.
J. Mol. Biol. 113, 237-251 (1977)

Rubin, G.M.: Preparation of RNA and ribosomes from yeast.
In: Methods in cell biology. Vol. XII: Yeast cells (Prescott, D.M., ed.) Academic Press/New York, 45-63 (1975)

Sanders, J.P.M., Heyting, C., Difranco, A., Borst, P., Slonimski, P.P.: The organization of genes in yeast mitochondrial DNA.
In: The genetic functions of mitochondrial DNA (Saccone, C., Kroon, A.M., eds.) Elsevier/North Holland, Amsterdam, 259-272 (1976)

Sanders, J.P.M., Heyting, C., Verbeet, M.P., Meijlink, F.C.P., Borst, P.: The organization of genes in yeast mitochondrial DNA. III. Comparison of the physical maps of the mitochondrial DNAs from three wild-type strains.
Mol. Gen. Genet. 157, 239-260 (1977a)

Sanders, J.P.M., Verbeet, M.P., Meijlink, F.C.P.W., Heyting, C., Borst, P.: The construction of the physical maps of three different Saccharomyces mitochondrial DNAs.
Mol. Gen. Genet. 157, 271-281 (1977b)

Schatz, G., Mason, T.L.: The biogenesis of mitochondrial proteins.
Annu. Rev. Biochem. 43, 51-87 (1974)

Schatz, G., Butow, R.A.: How are proteins imported into mitochondria?
Cell 32, 316-318 (1983)

Schmelzer, C., Schmidt, C., Schweyen, R.J.: Identification of splicing signals in introns of yeast mitochondrial split genes: mutational alterations in intron bI1 and secondary structures in related introns.
Nucl. Acids Res. 10, 6797-6808 (1982)

Schneller, J.M., Schneller, C., Stahl, A.J.C.: Immunological study of yeast mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase.
In: Genetics and biogenesis of chloroplasts and mitochondria (Bücher, T., Neupert, W., Sebald, W., Werner, S., eds.) Elsevier/North Holland, Amsterdam, 775-778 (1976)

Schweyen, R.J., Steyrer, U., Kaudewitz, F., Dujon, B., Slonimski, P.P.: Mapping of mitochondrial genes in Saccharomyces cerevisiae: population and pedigree analysis of retention or loss of four genetic markers in rho$^-$ cells.
Mol. Gen. Genet. 146, 117-132 (1976a)

Schweyen, R.J., Weiss-Brummer, B., Backhaus, B., Kaudewitz, F.: Localization of seven gene loci on a circular map of the mitochondrial genome of Saccharomyces cerevisiae.
In: The genetic functions of mitochondrial DNA (Saccone, C., Kroon, A.M., eds.) Elsevier/North Holland, Amsterdam, 251-283 (1976b)

Schweyen, R.J., Backhaus, B., Mathews, S., Kaudewitz, F.: On the formation of rho$^-$ petites in yeast. V. Mapping by rho$^-$ deletion analysis and rho$^+$ x rho$^+$ recombination analysis of mitochondrial genes in Saccharomyces cerevisiae.
In: Genetics, biogenesis and bioenergetics of mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Thomas, D.Y., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.) de Gruyter/Berlin, 7-22 (1976c)

Schweyen, R.J., Weiss-Brummer, B., Backhaus, B., Kaudewitz, F.: The genetic map of the mitochondrial genome including the fine structure of cob and oxi clusters.
In: Mitochondria 1977: genetics and biogenesis of mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.) de Gruyter/Berlin, 139-148 (1977)

Schweyen, R.J., Weiss-Brummer, B., Backhaus, B., Kaudewitz, F.: The genetic map of the mitochondrial genome in yeast: map positions of drug^R and mit$^-$ markers as revealed from population analyses of rho$^-$ clones in Saccharomyces cerevisiae.
Mol. Gen. Genet. 159, 151-160 (1978)

Sebald, W., Wachter, E., Tzagoloff, A.: Identification of amino acid substitutions in the DCCD-binding subunit of the mitochondrial ATPase complex from oligomycin resistant mutants of Saccharomyces cerevisiae.
Eur. J. Biochem. 100, 599-606 (1979)

Sena, E.P., Welch, J.W., Halvorson, H., Fogel, S.: Nuclear and mitochondrial DNA during zygote formation and maturation in yeast.
Science 194, 435 (1975)

Sena, E.P., Papay, M., Kuerti, R.: Cytoplasmic mixing in Saccharomyces cerevisiae: studies on a grande x neutral petite mating and implications for the mechanism of neutrality.
Curr. Genet. 3, 109-118 (1981)

Slonimski, P.P., Perrodin, G., Croft, J.H.: Ethidium-bromide induced mutation of yeast mitochondria: complete transformation of cells into respiratory deficient non-chromosomal petites.
Biochim. Biophys. Res. Commun. 30, 232-239 (1968)

Slonimski, P.P., Tzagoloff, A.: Localization in yeast mitochondrial DNA of mutations expressed in a deficiency of cytochrome oxidase and/or coenzyme QH_2 cytochrome c reductase.
Eur. J. Biochem. 61, 27-41 (1976)

Slonimski, P.P., Claisse, M.L., Foucher, M., Jacq, C., Kochko, A., Lamouroux, A., Pajot, P., Perrodin, P., Spyridakis, A., Wambier-Kluppel, M.L.: Mosaic organization and expression of the mitochondrial DNA region controlling cytochrome c reductase and oxidase. I. Genetic, physical and complementation maps of the box region.
In: Biochemistry and Genetics of yeast: pure and applied aspects.

(Bacila, M., Horecker, B.L., Stoppani, A.O.H., eds.) Academic Press/New York, 391-401 (1978a)

Slonimski, P.P., Pajot, P., Jacq, C., Foucher, M., Perrodin, G., Kochko, A., Lamouroux, A.: Mosaic organization and expression of the mitochondrial DNA region controlling cytochrome c reductase and oxidase. I. Genetic, physical and complementation maps of the box region.
In: Biochemistry and genetics of yeast: pure and applied aspects (Bacila, M., Horecker, B.L., Stoppani, A.O.H., eds.) Academic Press/New York, 339-368 (1978b)

Sor, F., Fukuhara, H.: Unequal excision of complementary strands is involved in the generation of palindromic repetitions of rho⁻ mitochondrial DNA in yeast.
Cell 32, 391-396 (1983)

Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975)

Tabak, H.F., Hecht, N.B., Menke, H., Hollenberg, C.P.: The gene for the small ribosomal RNA on yeast mitochondrial DNA: physical map, direction of transcription and absence of an intervening sequence.
Curr. Genet. 1, 33-43 (1979)

Terpstra, P., Butow, R.A.: The role of var1 in the assembly of yeast mitochondrial ribosomes.
J. Biol. Chem. 254, 12662-12669 (1979a)

Terpstra, P., Zanders, E., Butow, R.A.: The association of var1 with the 38S mitochondrial ribosomal subunit in yeast.
J. Biol. Chem. 254, 12653-12661 (1979b)

Thalenfeld, B.E., Tzagoloff, A.: Assembly of the mitochondrial membrane system: sequence of the OXI2 gene of yeast mitochondrial DNA.
J. Biol. Chem. 255, 6173-6180 (1980)

Tzagoloff, A., Akai, A., Needleman, R.B., Zulch, G.: Assembly of the mitochondrial membrane system: cytoplasmic mutants of Saccharomyces cerevisiae with lesions in enzymes of the respiratory chain and in the mitochondrial ATPase.
J. Biol. Chem. 250, 8236-8242 (1975a)

Tzagoloff, A., Akai, A., Needleman, R.B.: Properties of cytoplasmic mutants of Saccharomyces cerevisiae with specific lesions in cytochrome oxidase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2054-2057 (1975b)

Tzagoloff, A., Akai, A., Foury, F.: Assembly of the mitochondrial membrane system.XVI. Modified form of the ATPase proteolipid in oligomycin-resistant mutants of Saccharomyces cerevisiae.
FEBS Lett. 65, 391-395 (1976b)

Tzagoloff, A., Nobrega, M., Akai, A., Macino, G.: Assembly of the mitochondrial membrane system: organization of yeast mitochondrial DNA in the OLI1 region.
Curr. Genet. 2, 149-157 (1980)

Weiss-Brummer, B., Rödel, G., Schweyen, R.J., Kaudewitz, F.: Expression of the split gene cob in yeast: evidence for a precursor of a 'maturase' protein translated from intron 4 and preceeding exons.
Cell 29, 527-536 (1982)

van Ommen, J.G.B., Groot, G.S.P., Grivell, L.A.: Transcription maps of mtDNAs of two strains of Saccharomyces: transcription of strain-specific insertions; complex RNA maturation and splicing.
Cell 18, 511-523 (1979)

Waring, M.J.: Structural requirements for the binding of ethidium to nucleic acids.
Biochem. Biophys. Acta 114, 234-244 (1966)

Weislogel, P.A., Butow, R.A.: Low temperature and chloramphenicol induction of respiratory-deficiency in a cold-sensitive mutant.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 52-58 (1970)

Williamson, D.H.: The effect of environmental and genetic factors on the replication of mtDNA in yeast.
Symp. Soc. Exp. Biol. 24, 247-276 (1970)

Williamson, D.H., Fennell, D.J.: The use of DNA-binding agent for detecting and separating yeast mitochondrial DNA.
In: Methods of cell biology. Vol. XXII (Prescott, D.M., ed.)
Academic Press/New York, 335-351 (1975)

Wintersberger, U., Blutsch, H.: DNA-dependent DNA polymerase from yeast mitochondria: dependence of enzyme activity on conditions of cell growth and properties of the highly purified polymerase.
Eur. J. Biochem. 68, 199-207 (1976)

Wolf, K., Dujon, B., Slonimski, P.P.: Mitochondrial genetics. V. Multifactorial crosses involving a mutation conferring paromomycin-resistance in Saccharomyces cerevisiae.
Mol. Gen. Genet. 125, 53-90 (1973)

Am Ende dieser Arbeit möchte ich allen danken, die zu ihrer Enstehung beigetragen haben.

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. R.J. Schweyen für die Anregung und grosszügige Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.
Herrn Prof. Dr. W. Bandlow danke ich für seine Förderung und und Unterstützung bei allen biochemischen Fragen, die im Rahmen dieser Arbeit berührt wurden.
Allen Mitarbeitern des Institutes danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und für nützliche Diskussionen.
Ein grosser Teil dieser Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziert.

Lebenslauf

1949	geboren am 27.5. in Bombay/Indien
1954-1968	Schulen:
	Deutsche Schule, Kabul/Afghanistan
	Convent of Jesus and Mary, Mussoorie/Indien
	Deutsche Schule, Beirut/Libanon
	Gymnasium Seligenthal, Landshut
1968	Abitur
1968-1976	Studium der Biologie an der Universität München
1972	Vordiplom
1976	Diplom
1977-1981	Durchführung der Dissertationsarbeit bei Prof. Dr. R.J. Schweyen, Genetisches Institut/München
seit 1982	Empfänger eines Forschungsstipendiums der Max-Planck-Gesellschaft/München; Abteilung Prof. Dr. D. Oesterhelt